

Reconocimiento antigénico de ovinos naturalmente infectados con *Fasciola Hepatica*, monitoreado a través de inmunolectrotransferencia enzimática (Western Blotting)

T. Gorman, M.V., M.P.V.M.; A. Valdés, M.V.; F. Fredes, M.V.; A. Ferreira, M.V., Ph.D.; H. Alcáño, M.V., Ph. D.

Depto. Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile.

SUMMARY

Immunological recognition in naturally *Fasciola hepatica* infected sheep, monitored by and enzymatic immunolectrotransference assay (western blotting)

In order to verify the presence of immunodiagnostic antigenic fractions and their persistence in the course of a natural infection, the immune response of *Fasciola hepatica* infected sheep was studied. Serum samples from 10 lambs were obtained before their exposure to the natural infection and then every 15 days after exposure, for a period of 12 months. Two antigenic preparations, namely somatic and excretion-secretion *F. hepatica* antigens, were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis followed by an enzymatic immunolectrotransference assay. The serum samples were incubated individually as well as in pools. Additionally, 30 serum samples from sheep with other parasitic infections (hydatid cysts, *Thysanosoma actinioides*) were also included as controls. The pattern of antigenic recognition presented four prominent band groups: 36-38; 30-33; 26-28 and 19-23 kDA, which were only detected in *F. hepatica* infected sheep. These were observed 1.5 month after infection up to the end of the experimental period, but were not detected in sheep with other parasitic infections.

Palabras claves: ovinos, inmunodiagnóstico, *Fasciola hepatica*.

Key words: sheep, immunodiagnosis, *Fasciola hepatica*.

INTRODUCCION

Entre las enfermedades parasitarias que afectan al hombre y a las especies animales, se incluye la fasciolosis (Kassa y col., 1988), causada por *Fasciola hepatica*, que, además de producir enfermedad, determina una disminución del rendimiento productivo en especies de abasto e importantes pérdidas económicas por el decomiso de órganos infectados no aptos para el consumo humano.

La fasciolosis se presenta desde la I hasta la XI Región, siendo más afectada la zona geográfica comprendida entre la IV y IX Regiones, y sólo la XII Región se encuentra libre de fasciolosis (Chile, 1989). En el año 1988 la prevalencia fue de 32.4% en vacunos, 3.4% en ovinos, 2.0% en porcinos, 13.6% en equinos y 14.2% en caprinos (Chile, 1989), lo que en un año puede significar el decomiso de 1.500 toneladas de hígados (estimando un peso aproximado del hígado de vacuno de 6 kg, el del cerdo 2 kg y el de ovino 1 kg). La fasciolosis ha desplazado incluso a la hidatidosis como la zoonosis de mayor prevalencia en las reses de abasto beneficiadas en los mataderos controlados por los Servicios de Salud (Chile, 1989).

Aceptado: 15.05.95.

Financiado por FONDECYT, Proyectos 91/1176 y 94/0245.

Esto demuestra que a pesar de que se dispone de drogas para tratar a los animales afectados, esta zoonosis no ha disminuido frente a estrategias basadas exclusivamente en tratamientos farmacológicos.

El diagnóstico de la fasciolosis en los animales vivos se realiza rutinariamente mediante exámenes coprológicos que detectan los huevos eliminados por los parásitos adultos. Esta técnica no siempre logra pesquisar la infección y a veces se requiere de repetidos exámenes para verificar la presencia de huevos. Por otra parte, ellos son ineficaces para el diagnóstico de las infecciones tempranas y agudas, dado que los parásitos son inmaduros y aún no producen huevos (período prepatente) (Van Tiggele y Over, 1976). En tal sentido, un diagnóstico temprano de la enfermedad sería muy adecuado ya que permitiría un tratamiento oportuno, evitando además que los parásitos lleguen a adultos y que por lo tanto vayan a contaminar con sus huevos el ambiente. Los exámenes coprológicos, tampoco son muy sensibles cuando la carga parasitaria es muy baja. Estudios recientes han permitido establecer que el examen coprológico de sedimentación ofrece una sensibilidad promedio de 77.5% en 353 animales de matadero infectados (Gorman y col., 1991).

Existen también métodos bioquímicos que pueden servir para diagnosticar la infección, ya que al existir un daño celular hepático por la migración de las fasciolas juveniles, aumenta la actividad y concentración plasmática de enzimas tales como glutamato dehidrogenasa, sorbitol dehidrogenasa, gama-glutamil transpeptidasa (Rowlands y Clampitt, 1979; Sykes y col., 1980). Sin embargo, se debe mencionar que estos métodos no son específicos ya que miden un daño hepático cuyo origen puede ser diverso.

En los últimos años las investigaciones se han enfocado a buscar alternativas diagnósticas más eficientes, aplicables en gran escala, y entre éstas, las pruebas inmunológicas surgen como una alternativa interesante (Hillyer, 1986). Recientemente ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ha demostrado una sensibilidad y especificidad promedio de 61.6% y 71.7%, respectivamente, en animales infectados (Gorman y col., 1991). Estos valores no son óptimos porque probablemente al emplear extractos antigénicos crudos se originan reacciones inespecíficas o cruzadas por la presencia de de-

terminantes antigénicos compartidos con otros parásitos (Gorman y col., 1991).

Estudios recientes, empleando electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones de reducción (SDS-PAGE), han permitido describir que existen ciertas fracciones de interés diagnóstico en antígenos somáticos y de excreción de fasciolas. Las fracciones oscilaron entre 16 y 56-58 kDa y éstas fueron reconocidas sólo por ovinos infectados con el parásito (Gorman y col., 1994). Algunas de las fracciones fueron incluso detectadas por los animales durante el período prepatente (26-28; 35-36 kDa).

El objetivo del presente trabajo es realizar un monitoreo inmunológico durante el transcurso de una infección natural por *F. hepatica* en ovinos, para así precisar el reconocimiento de fracciones antigénicas específicas, fundamentalmente en cuanto a su aparición y persistencia en un curso prolongado de infección.

MATERIAL Y METODOS

I ANTIGENOS

Antígenos somáticos de F. hepatica adultas (Fh S). Se colectaron especímenes adultos y vivos de fasciolas desde el hígado de animales beneficiados en una planta faenadora de carnes local. Alrededor de 200 parásitos se lavaron con 8 a 10 cambios de solución salina isotónica (NaCl 0.85%), el primero de ellos conteniendo merthiolate al 0.01%. Posteriormente se congelaron a -20°C en 10 ml de solución salina. Al día siguiente, el material semicongelado se trituró en un mortero, luego en un triturador de tejidos y finalmente en un homogenizador, manteniendo el frasco en un baño de hielo. Se extrajo el contenido lipídico del preparado agregando 30 ml de éter a un volumen final de 100 ml de agua destilada y manteniendo esta mezcla a 37°C durante 16 horas aproximadamente. El material resultante se reconstituyó en 100 ml de agua destilada y se centrifugó durante 20 minutos a 7.602 X g, a 4°C. El sobrenadante se dializó durante 24 horas contra agua destilada a 4°C con tres recambios (Gorman y col., 1991). Este preparado se distribuyó en alícuotas y se congeló a -70°C hasta su uso. Su concentración proteica fue de 1.9 ug/ul, según el método de Bradford (1976).

Antígenos de excreción-secreción de F. hepatica adultas (Fh E-S). En forma similar las fasciolas vivas fueron lavadas en solución salina y luego se incubaron por 18 horas a 37°C a baño María, en solución Hedon-Fleig estéril en una proporción de 1 ml/fasciola (Morilla y Bautista, 1986). Luego se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 7.602 X g, durante 20 min a 4°C. Se guardó en alícuotas, a -70°C hasta su uso. Su contenido proteico fue de 2.24 ug/ul de acuerdo a lo establecido por Bradford (1976).

II SUEROS

Se emplearon 10 ovinos procedentes de una estación experimental (Hidango, Ministerio de Agricultura) libres de fasciolosis, que luego se trasladaron a un predio de la VII Región, donde la infección es hiperendémica y en una época conocida de máxima infestación ambiental con metacercarias (Alcaíno y col., 1992). Luego de un mes de permanencia, los corderos se trasladaron a dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Se les extrajo sangre antes de ser expuestos y luego, quincenalmente, durante doce meses, para el monitoreo serológico. Sólo dos extracciones sanguíneas se omitieron (la de 15 días de infección y la vigésima extracción). Ante la imposibilidad de precisar el momento de la infección de cada cordero, se adoptó arbitrariamente el criterio de considerar que a la llegada a la Facultad ellos presentaban una infección de 15 días. Su alimentación fue en base a pellets de alfalfa y agua a discreción.

En el estudio se incluyeron, además, 30 sueros de ovinos sin fasciolosis (procedentes de la XII Región), e infectados con cestodos (*Thysanosoma actinioides*) o estados larvarios de cestodos (hidatidosis). Los sueros fueron analizados en cada extracción tanto en forma individual como agrupados ("pool").

III TECNICAS

Al momento de realizar las extracciones de sangre se tomaron muestras de excrementos quincenalmente, de todos los ovinos, y fueron analizadas mediante exámenes coprológicos de sedimentación según procedimiento estándar. Así se logró establecer la duración de la fase prepatente, el inicio de la fase patente y la confirmación de la infección natural.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los preparados antigénicos se sometieron a electroforesis en minigeles (8 x 7 x 1 mm) de poliacrilamida al 12%, en una cámara vertical (Mini-Protean II, BIO-RAD), en presencia de dodecilsulfato de sodio, en condiciones de denaturación completa (Tsang y col., 1986). Se colocó en el carril central del gel la solución de muestra equivalente a 100 ug de proteína de los antígenos S y 150 ug, en el caso de antígenos E-S. En cada corrida electroforética se incluyó un marcador comercial con un rango de 14.2 a 66 kDa. Se empleó una corriente de 100 V durante la corrida en el gel de resolución, completándose ésta cuando el frente alcanzaba el borde inferior de la placa de vidrio.

Inmunoelectrotransferencia. Al término de la electroforesis, las proteínas separadas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa, realizando la transferencia a 100 volts durante 90 minutos, a 4°C. Luego se retiró la nitrocelulosa y se lavó la membrana 4 veces en buffer fosfato salino pH 7.2 (PBS) en agitación constante. La lámina de nitrocelulosa (NC) se cortó en tiras de 4 mm de ancho en forma paralela al eje de migración de la electroforesis, numerando cada tira en orden secuencial.

Las tiras de NC se incubaron toda la noche en solución bloqueadora (leche descremada al 5% en PBS adicionado de Tween al 0.5% = PBS-T20) en refrigeración. Luego se lavaron 5 veces en PBS-T20 y se incubaron durante dos horas, en agitación constante y a temperatura ambiente con los sueros en estudio, diluidos 1/100, en PBS-T20. Después de 5 lavados de 5 minutos cada vez, con PBS-T20 en agitación constante, se incubaron las tiras de NC con el conjugado anti-IgG-oveja (diluido 1/1.000 en PBS-T20, previa titulación) durante 2 horas en agitación constante y a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS-T20 y dos con PBS las membranas de NC se colocaron en un sustrato constituido por diamino-benzidina (20 ml PBS; 10 mg diamino-benzidina en 200 ul de agua destilada; 4 ul de agua oxigenada). Al aparecer las bandas, las tiras de NC se retiraron y se lavaron en agua destilada 10 veces (Tsang y col., 1986).

En la selección de las fracciones polipeptídicas de importancia diagnóstica se descartaron las que también se presentaban en los sueros controles (sanos y con otras parasitosis). Se ela-

boró un gráfico para cada gel, y una vez trazada la curva semilogarítmica para el estándar comercial, se interpolaron las movilidades relativas observadas para cada banda en cada gel, obteniendo, de esta manera, su peso molecular correspondiente.

Doble difusión en geles de agarosa (DD). Simultáneamente al empleo de SDS-PAGE se analizaron los sueros de cada sangría mediante DD en geles de agarosa (Gorman y col., 1990). Para ello se cubrieron portaobjetos con 3 ml de una solución de agarosa al 1.2% en buffer barbital, 0.05 M, pH 8.2. Se cortaron pocillos en forma de roseta, ubicando en el pocillo central el antígeno S y en la periferia los sueros en estudio y un control positivo. Luego de incubar las láminas por 48 horas en cámara húmeda se realizó la interpretación, considerándose positivos los sueros que presentaban una o más líneas de precipitación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las técnicas basadas en la detección de anticuerpos constituyen actualmente una gran atracción para el diagnóstico de fasciolosis, ya que permiten procesar una gran cantidad de muestras en un breve plazo (Hillyer, 1986; Santiago y Hillyer, 1988). Sin embargo, es preciso contar con preparados antigénicos que sean sensibles y que no reaccionen con otros antígenos parasitarios, es decir, que sean específicos. En tal sentido, las técnicas de SDS-PAGE y posterior inmunoelectrotransferencia enzimática o "western blotting" ofrecen la posibilidad de identificar aquellos polipéptidos que reúnen las cualidades señaladas. Su aplicación, en este estudio, señala el inicio del reconocimiento de estos polipéptidos desde una etapa temprana y en distintos intervalos del curso de la infección.

Los sueros de los ovinos infectados al ser enfrentados a los antígenos S y E-S reconocieron entre 6 a 23 fracciones inmunorreactivas, lo que corrobora la complejidad antigénica de este parásito (Reddington y col., 1984; Gorman y col., 1992, 1994). De ellas, se seleccionaron las más relevantes desde el punto de vista diagnóstico, aplicando los criterios de sensibilidad, persistencia en el tiempo y especificidad.

Los antígenos S frente a los sueros "en pool" exhibieron tres grupos de bandas de 35-38, 30-

33 y 19-23 kDa (cuadro 1). Ellas fueron detectables desde los dos meses de infección, un mes y medio y un mes de infección, respectivamente, y hasta los 12 meses de infección. Por otra parte, empleando antígenos E-S frente a los sueros "en pool", se presentaron patrones de reconocimiento similares a los anteriores, dado que tendrían componentes antigénicos comunes (figura 1). Tal fue el caso de las fracciones de 36-39 y 30-33 kDa. La fracción de 19-23 kDa descrita en el antígeno S no fue observada con los antígenos E-S (cuadro 1, figura 1), frente a los sueros en pool, pero sí se pesquisó en los sueros individuales, en 17 de las 22 sangrías realizadas en el período estudiado.

Al analizar individualmente los 10 sueros en las 22 extracciones sanguíneas correspondientes a los 12 meses estudiados, tal como se esperaba, los resultados fueron bastante concordantes con los resultados de los sueros en pool (cuadro 1); seleccionándose para los antígenos S y E-S nuevamente las fracciones de 35-38, 30-33, 26-28 y 19-22 kDa (figura 2). Estos resultados son semejantes a los de Santiago y Hillyer (1986), quienes señalaron como importantes las fracciones 27-38, 18-23 y 11-14 kDa, empleando un antígeno S semipurificado, frente a sueros de pacientes humanos, conejos y bovinos infectados con *F. hepatica*. La fracción comprendida entre 11-14 kDa no fue observable en nuestro estudio, siendo 14 kDa el límite más bajo del estándar empleado. Tampoco logramos detectar la fracción de 12 kDa, identificada por algunos autores en infecciones por *F. hepatica* y *Schistosoma mansoni* (Hillyer y col., 1987, 1990). Así también los mismos autores describen la fracción de 17 kDa como importante desde el punto de vista diagnóstico; sin embargo, en nuestro estudio esta fracción demostró reacción cruzada con sueros de ovinos con otras parasitosis (cuadro 2). La atención en la búsqueda de polipéptidos inmunorrelevantes se ha enfocado en aquellos de bajo PM, tales como una cisteína proteasa de 27 kDa, una fracción de 12 kDa correspondiente a una proteína unida a ácido graso, una glutatión S transferasa, etc. (Hillyer, 1993). Cabe destacar que las fracciones de PM más bajo son las que presentan mayor posibilidad de error en su estimación, por lo que sería recomendable dedicar atención a estos polipéptidos para aclarar con mayor exactitud su relevancia diagnóstica.

Cuadro 1

Fracciones antigénicas detectadas mediante inmunoelectrotransferencia enzimática en 10 ovinos (individuales y "en pool"), durante 12 meses de infección por *Fasciola hepatica* (22 extracciones).

Polypeptides detected by immunowestern assay, in 10 Fasciola hepatica infected sheep (pooled and individually) during 12 months of infection (22 bleedings).

Antígenos <i>F. hepatica</i>	Fracciones antigénicas		Frecuencia n/22
	En pool	Individuales	
Fh S	35-38	35-38	14
	30-33	30-33	16
	-	26-28	17
	19-23	19-22	15
Fh E-S	36-39	35-38	16
	30-33	30-33	17
	26-28	26-28	19
	-	19-22	17

Fh S = antígenos somáticos de *F. hepatica*.

Fh E-S = antígenos de productos de excreción- secreción de *F. hepatica*.

Cuadro 2

Fracciones inespecíficas (kDa) observadas en ovinos mediante inmunoelectrotransferencia enzimática, previo a la infección por *Fasciola hepatica* (DIA = 0) y en ovinos sin *F. hepatica* con hidatidosis (n = 27) o con *Thysanosoma actinioides* (n = 3)

Non specific fractions (kDa) detected by an immunoprobe assay, in sheep previously exposed to *Fasciola hepatica* (DAY 0) and in non infected sheep but with hydatid cysts (n = 27) or *T. actinioides* (n=3).

DIA 0 kDa	Hidatidosis		<i>T. actinioides</i>	
	kDa	Frecuencia N=27	kDa	Frecuencia N=3
58-60	60	8	-	-
48-52	48	14	-	-
39-43	43-45	12	-	-
29	29	26	29	3
-	25	25	25	3
18-15	16-17	27	16-17	3

Las fracciones de 26-28 y 30-33 kDa son relativamente coincidentes con las de 25-30 kDa descritas por Rivera y col. (1988), en sueros de conejos, con las de 20-23 y 23-27 kDa observadas en ovinos experimentalmente infectados (Ruiz-Navarrete y col., 1993) y con la de 26 kDa, correspondiente a antígenos encontrados en bilis y excrementos de bovinos infectados (El-Bahi y col., 1992). En forma similar, estas fracciones también las observamos durante la fase prepatente de la infección en ovinos, empleando como método de detección la autorradiografía con ¹²⁵I (Gorman y col., 1994).

El estudio individual de los sueros permitió, a su vez, precisar la frecuencia de presentación de estas bandas entre los ovinos y para cada intervalo de muestreo durante el período experimental (figura 3). Como resultado de ello, se pudo establecer que todas ellas fueron detectables antes que los exámenes coprológicos, es decir, en el período prepatente de la infección. La de 35-38 y 30-33 kDa se visualizaron desde 1.5 mes de infección y las 26-28 y 19-22 kDa, desde los 2 meses (cuadro 1, figura 3).

Por otra parte, se debe recalcar que fue de gran importancia incorporar al estudio muestras de sueros de ovinos comprobadamente negativos a fasciolosis (procedentes de una Estación Experimental) y sueros de animales con otros parasitismos (procedentes de la XII Región, área libre de fasciolosis), puesto que ello permitió realizar en forma rigurosa la selección de bandas de interés diagnóstico. Es así como en los sueros de los ovinos antes de la exposición (Día 0) se observaron algunas bandas (cuadro 2, figuras 1 y 2). Lo mismo ocurrió con los sueros de aquellos con otros parasitismos y libres de *F. hepatica* (cuadro 2, figuras 1 y 2). Estas bandas se consideraron como reacciones cruzadas o inespecíficas, siendo descartadas por su escasa relevancia diagnóstica.

Los exámenes coprológicos realizados a los 2.5 meses de infección (según criterio señalado anteriormente) indicaron la ausencia de huevos de *F. hepatica*. Sólo a los 3 meses de infección se comprobó la infección en 7 de los 10 ovinos, encontrándose la totalidad de ellos infectados en los exámenes practicados a los 3.5 meses de infección.

La DD, por otra parte, demostró la presencia de bandas de precipitación en 2 de 10 corderos a partir de un mes de infección. Al cabo de 2.5

meses de infección, 9 de los 10 corderos fueron positivos a esta técnica, persistiendo en esta condición hasta el final del período experimental.

Estos resultados indican que las bandas seleccionadas (35-38, 30-33, 19-22 y 26-28 kDa) representan fracciones candidatas para ser usadas en inmunodiagnóstico, dadas su sensibilidad, especificidad y persistencia. Su posterior semipurificación y evaluación en pruebas inmunodiagnósticas de rutina representa una importante expectativa. Se logra, además, una gran aplicación en medicina humana, al permitir un diagnóstico oportuno y probablemente el monitoreo del éxito quimioterapéutico de la enfermedad.

RESUMEN

Con el propósito de evaluar la respuesta humoral frente a antígenos somáticos y de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* y conocer

la persistencia del reconocimiento antigénico durante el curso de la infección natural, se monitorearon diez ovinos durante 12 meses. La infección se realizó manteniendo a los corderos por un mes en un predio donde la fasciolosis es endémica, siendo ésta confirmada posteriormente por exámenes coprológicos individuales de sedimentación, realizados cada 15 días. Se extrajo sangre cada 15 días y las muestras de sueros se analizaron individualmente y "en pool". Las muestras obtenidas antes de la infección y las de 30 ovinos con otros parasitismos procedentes de áreas libres de fasciolosis se emplearon como controles. Los antígenos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condición de reducción (SDS) y posterior inmunoelectrotransferencia enzimática para identificar los polipéptidos reconocidos por los ovinos infectados. Los resultados indicaron la presencia de cuatro grupos de polipéptidos de relevancia diagnóstica correspondientes a 19-23, 26-28, 30-33 y 35-38 kDa, los que fueron reconocidos por los animales a

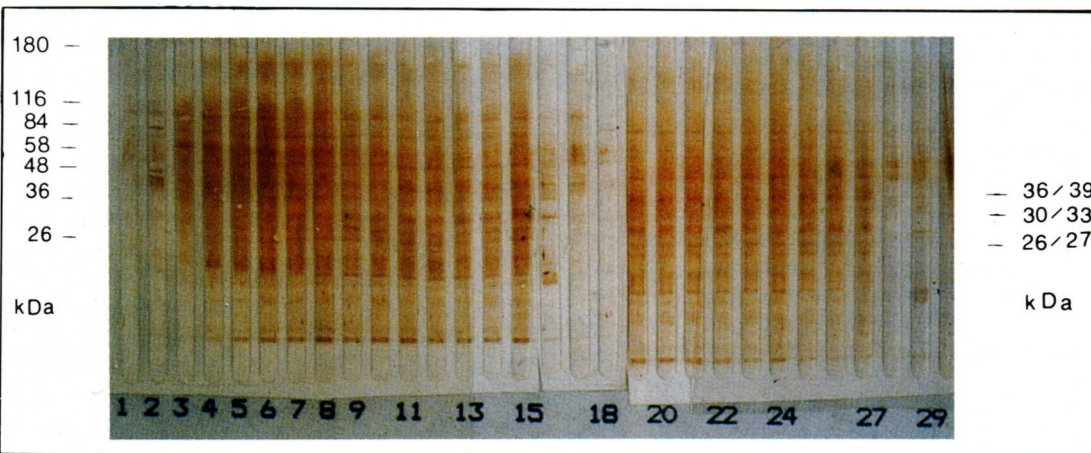


Figura 1. Monitoreo serológico de ovinos infectados con *Fasciola hepatica*, mediante "Western Blotting" durante 12 meses. Muestras "en pool".

Carriles 0 y 18 = Día 0.

Carriles 2 al 15 = Ovinos infectados con *F. hepatica* desde 1 a 7.5 meses de infección.

Carriles 19 al 27 = Ovinos infectados con *F. hepatica* desde 8 a 12 meses de infección.

Carriles 16 y 29 = Infectados con *Thysanosoma actinioides*.

Carriles 18 y 30 = Infectados con hidatidosis.

Serological monitoring of *Fasciola hepatica* infected sheep, by and enzyme immunowestern assay using excretory- secretory (E-S) antigens. Pooled serum samples. Lanes 0 and 18 = Day 0.

Lanes 2-15 = *F. hepatica* infected sheep from 1 to 7.5 months of infection.

Lanes 19-27 = *F. hepatica* infected sheep from 8 to 12 months of infection.

Lanes 16 and 29 = Infected with *Thysanosoma actinioides*.

Lanes 18 and 30 = Infected with hydatid cysts.

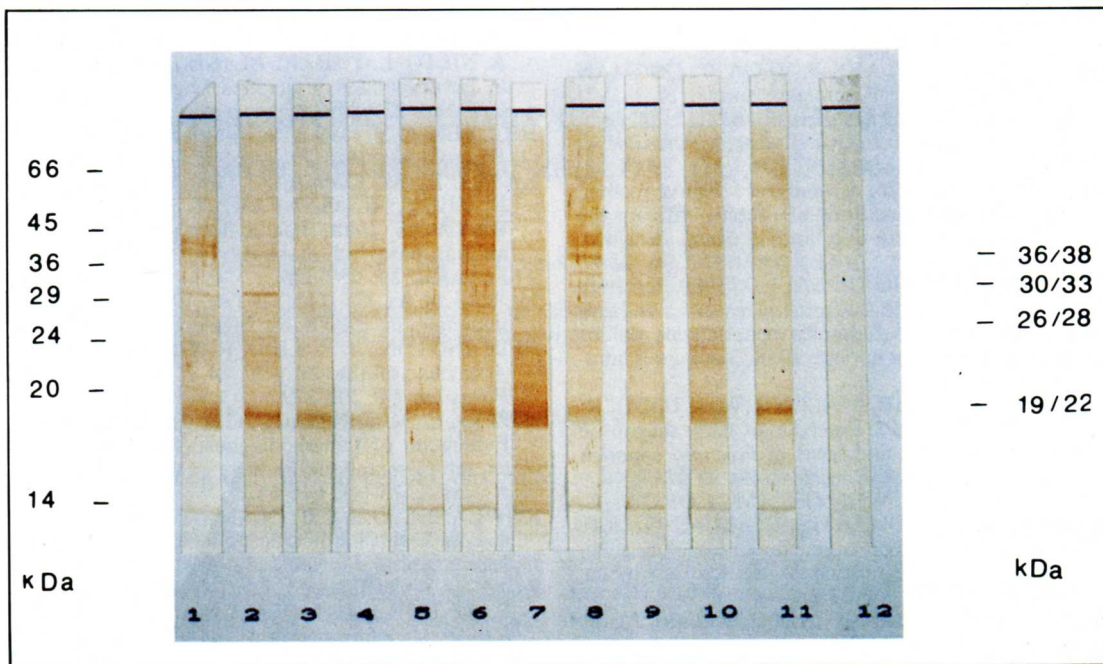


Figura 2. Fracciones inmunorreactivas observadas en 10 ovinos a los 3 meses de infección por *Fasciola hepatica* mediante "Western blotting".

Carril 1-11 = Infectados.
Carril 12 = Pool de sueros de ovinos sanos.

Immunoreactive bands seen in 10 sheep at three months of *Fasciola hepatica* infection by western blotting.
Lanes 1-11 = Infected sheep.
Lane 12 = Pool of healthy sheep.

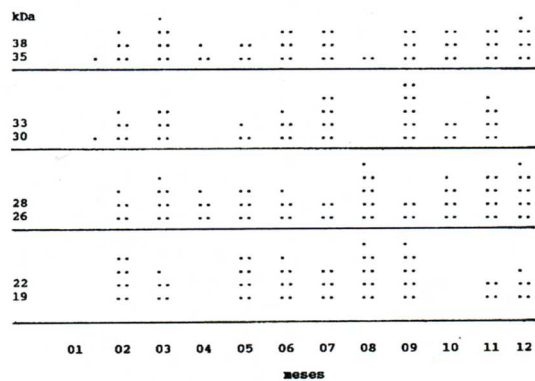


Figura 3. Frecuencia de 4 fracciones antigénicas detectadas (.) en 10 ovinos infectados con *Fasciola hepatica* mediante enzimo-inmuno-electrotransferencia enzimática, en doce meses.

Frequency of 4 antigenic fractions individually recognized (.) by 10 *Fasciola hepatica* infected sheep, monitored by an enzyme immunotransfer assay during 12 months.

partir de 1.5 mes de infección y durante los doce meses estudiados. Como estas bandas no fueron detectadas por ovinos con otras parasitosis, se puede concluir que ellas constituyen fracciones polipeptídicas de gran proyección inmunodiagnóstica dada su alta especificidad, sensibilidad y persistencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Dr. Rigofredo Veneros M.V. del Servicio Agrícola y Ganadero en Punta Arenas, por su gran colaboración en proveernos muestras de ovinos controles y al Fondo de Investigación y Tecnología (FONDECYT).

BIBLIOGRAFIA

- ALCAINO, H.A., W. APT, F. VEGA, T. GORMAN y P. APT. 1992. Fasciolosis animal en la VII Región de Chile: áreas de distribución e infecciones en caballos y conejos silvestres, *Parasitol. al Día* 16 (1-2): 11-16.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 1989. Información estadística de las principales enfermedades detectadas en los animales beneficiados en los mataderos del país durante 1988. Santiago (Circular 5877).
- EL-BAHI, M. M., J. B. MALONE, W. J. TODD, K. L. SCHNORR. 1992. Detection of stable diagnostic antigen from bile and feces of *Fasciola hepatica* infected cattle. *Vet. Parasitol.* 45: 157-167.
- GORMAN, T., J. WENZEL, M. LORCA, L. IBARRA, B. SAN MARTIN, H. ALCAINO. 1990. Pruebas de inmunoprecipitación y hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la fasciolosis ovina, *Parasitol. al Día* 14: 51-56.
- GORMAN T., P. MORENO, M. LORCA, L. IBARRA, H. ALCAINO. 1991. Inmunodiagnóstico de las fasciolosis animal mediante una prueba inmunodiagnóstica (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: 26-32.
- HILLYER G. 1986. Fascioliasis, paragonimiasis, clonorchiasis and opistorchiasis. In: Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Ed. Walls and Schantz: 609-617.
- HILLYER G., M. I. GARCIA-ROSA, H. ALICEA y A. HERNANDEZ. 1987. Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12 kDa *Fasciola hepatica* cross reactive antigen, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 103-110.
- HILLYER G. V., M. GARCIA-ROSA, M. SOLER DE GALANES. 1990. Identification of *F. hepatica* molecules with immunodiagnostic and immunoprophylactic potential. In EHRLICH, R., A. NIETO, L. YARZABAL (eds.). Basic Research in Helminthiasis, Ediciones Logos, Montevideo Uruguay: 239-259 p.
- HILLYER G.V. 1993. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. *Parasitol. al Día* 17: 130-136.
- KASSA T., M. CORDERO DEL CAMPILLO, J. EUZEBY, S. GAAFAR, T. HIEPE, C.A. HIMONAS. 1988. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD), *Vet. Parasitol.* 29: 299-326.
- MORILLA A., C. BAUTISTA. 1986. Manual de inmunología. Ed. Diana, México, 397 pp.
- REDDINGTON, J., R. LEID, R. WESCOTT. 1984. A review of the antigens of *F. hepatica*, *Vet. Parasitol.* 14: 209-229.
- RIVERA C., N. SANTIAGO, G.V. HILLYER. 1988. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretion-secretion products of *F. hepatica*, *J. Parasitol.* 74 (4): 646-652.
- ROWLANDS, D.T, R.B. CLAMPITT. 1979. Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 5: 155-175.
- RUIZ-NAVARRETE M.A., C. ARRIAGA, C.R. BAUTISTA, A. MORILLA. 1993. *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory-secretory antigens recognized by infected sheep. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 35: 301-307.
- SANTIAGO N., G. HILLYER. 1986. Isolation of potential serodiagnostic *Fasciola hepatica* antigens by electroelution from polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 35 (6): 1210-1217.
- 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.
- 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. HANCOCK, M. WILSON, D. PALMER, S. WHALEY, J. MC DOUGAL, S. KENNEDY. 1986. Immunology Series. Nº 15. Procedural Guide. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia: 25 pp.
- VAN TIGGELE, L.J., H.J. OVER. 1976. Serological diagnosis of fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 1: 239-248.