

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACION DE FRACCIONES ANTIGENICAS,
ENZIMATICAS DE *FASCIOLA HEPATICA* EN EL
DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO DE FASCIOSIS EN
OVINOS, EQUINOS Y PORCINOS.

NORMAN EDGARDO AGUILERA QUEVEDO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: Dra. TEXIA GORMAN GOFFRERI
Financiado por Proyecto FONDECYT 194-0245
Proyecto de Enlace DID E005/97

SANTIAGO, CHILE
2007

INDICE

	Pag.
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	6
REVISION BIBLIOGRAFICA	9
OBJETIVOS	30
MATERIAL Y METODOS	31
RESULTADOS	37
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS	63

RESUMEN

La fasciolosis es una importante infección parasitaria en Chile y otros países causada por el tremátodo, *Fasciola hepatica*, el cual parasita los conductos biliares de las especies de abasto y otros hospederos.

Su importancia radica en las grandes pérdidas económicas que ocasiona debido a la disminución de la productividad de los animales infectados, muertes y decomiso de hígados en los mataderos, además de ser una zoonosis.

El diagnóstico convencional de esta parasitosis, se realiza mediante exámenes coprológicos de sedimentación que detectan los huevos eliminados por los parásitos adultos. Esta prueba es ineficaz para el diagnóstico de las infecciones tempranas, en que los parásitos son inmaduros y aún no producen huevos (etapa prepatente de la infección). Es así como se han desarrollado pruebas inmunológicas, capaces de detectar en forma temprana esta parasitosis permitiendo la aplicación de tratamientos en forma oportuna, evitando que las fasciolas juveniles lleguen a adultas y éstas contaminen el ambiente con los huevos que salen junto con los excrementos de los animales infectados. Además, permiten el procesamiento de un alto número de muestras a la vez.

El propósito de este trabajo fue evaluar la eficiencia diagnóstica de los antígenos enzimáticos purificados: Leucina aminopeptidasa (LAP) y Catepsinas L (CL1 y CL2) con sueros de animales de las especies ovina (90), porcina (60) y

equina (60), comparando los resultados con la fracción antigénica de ≤ 30 kDa y con el examen *post mortem* de los animales estudiados. Se empleó para ello la prueba inmunodiagnóstica de ELISA, que ha demostrado ser muy eficiente según la calidad del antígeno que se emplee.

El antígeno LAP fue el que presentó los resultados más satisfactorios, aunque sólo con la especie ovina, tanto en la etapa prepatente como patente de la infección con valores de sensibilidad de 86,7% y 93,3%, respectivamente. La especificidad demostrada fue de 86,7% en ambas fases de la infección. Sin embargo, los resultados obtenidos en las otras dos especies con la fracción LAP y con los antígenos enzimáticos catepsina CL1, CL2 fueron poco satisfactorios en las tres especies estudiadas, probablemente debido a una pérdida de actividad biológica a lo largo del tiempo transcurrido en el estudio.

Por su parte la fracción de ≤ 30 kDa, demostró nuevamente su importancia en el diagnóstico de la fasciolosis, al obtenerse altos valores de sensibilidad de 80% y 93,3% y de especificidad de 93,3% y 96,6% en la etapa prepatente y patente de la infección en ovinos, respectivamente.

La sensibilidad y especificidad de la fracción de < 30 kDa en el inmunodiagnóstico de la fasciolosis en porcinos y equinos también fueron elevadas (valores entre 80% y 90%).

ABSTRACT

Fasciolosis is an important parasitic infection in Chile and other countries and is caused by the trematode, *Fasciola hepatica*, which is located at the biliary ducts of animal species and man.

Its importance lies in the economic losses that it causes due to decreased productivity, mortality and liver condemnations of infected animals, besides being an important zoonosis.

The conventional diagnosis of this parasitism, is carried out by means of the sedimentation coprological exam which detects the eggs eliminated by the adult parasites. This test is ineffective in diagnosing early infections where the parasites are still immature and there is no egg production yet (prepatent phase of the infection).

Therefore, there is a need in developing other techniques and serology is the indirect method of choice, allowing the detection of early infection, opportune treatment and thus preventing contamination of the environment with the parasite eggs and also these techniques permit the processing of larger amount of samples.

The purpose of this study is to evaluate the diagnostic efficiency of the purified enzymatic antigens: Leucine aminopeptidase (LAP) and Cathepsin L (CL1 and CL2) with serum of three animal species, sheep (90), swine (60) and equines (60). The results were compared with the antigenic fraction of ≤ 30 kDa and with the *post mortem* examination of the animals. ELISA immunodiagnostic was used in all analysed sera.

With regard to the fractions, the LAP antigen was the one that exhibited satisfactory results although only sheep in the prepatent and patent phase with sensibility values of 86,7% and 93%, respectively. The specificity shown was 86,7% in both phases of the infection. However, the results obtained with this fraction in pigs and horses and the enzymatic antigens cathepsin CL1, CL2 in all three species, were quite unsatisfactory, probably due to a loss of biological activity along the months elapsed in their use.

On the other hand, the ≤ 30 kDa fraction again demonstrated a high performance in the diagnosis of fasciolosis, with high values of sensibility in the prepatent and patent phase of sheep infection (80% and 93%, respectively). The values of specificity obtained were also high, corresponding to 93% in the prepatent phase and 96% in the patent phase. In the case of equine and swine serum samples, the sensibility and specificity values were also high ranging from 80% and 96,6% in these species.

INTRODUCCION

Entre las enfermedades parasitarias, la fasciolosis o distomatosis, es una de las más importantes y frecuentes. En Chile es causada por el tremátodo *Fasciola hepatica* que parasita los conductos biliares de numerosas especies animales, principalmente pequeños y grandes rumiantes, tanto domésticos como silvestres así como también al hombre. Su prevalencia durante 1988 en los mataderos del país fue de 32,4% en bovinos; 3,4% en ovinos; 2,0% en porcinos; 13,6% en equinos, y 14,2% en caprinos (Chile, 1989).

Además de su importancia zoonótica, esta parasitosis provoca graves pérdidas económicas siendo la principal causa de decomisos de todas las especies de abasto, también debido a la disminución en la productividad de los animales infectados, muertes y gastos en su tratamiento.

En bovinos beneficiados en mataderos de nuestro país, es la zoonosis de mayor prevalencia, presentándose en un 30,1% de ellos entre los años 1989 a 1995 (Vásquez, 1998). Esto demuestra que, a pesar, del mayor conocimiento epidemiológico de esta enfermedad y de la existencia de numerosas y efectivas drogas para tratar a los animales afectados, aún sigue siendo un problema.

La fasciolosis es de distribución mundial, encontrándose en Chile, en todo el territorio, existiendo áreas con alta infección o hiperendémicas como la VII

Región. Hace excepción la XII Región, donde no existe la infección dados los requerimientos de temperatura y humedad del parásito para su desarrollo.

El ciclo biológico de *F. hepatica* es indirecto, ya que requiere la participación de un hospedero intermediario (caracol) que aloja las formas inmaduras del parásito, y un hospedero definitivo (mamífero herbívoro) que alberga al parásito adulto.

Rutinariamente, el diagnóstico se realiza mediante el examen coproparasitario de sedimentación que permite visualizar los huevos eliminados por las fasciolas adultas. Este método es sencillo y de bajo costo, pero no permite pesquisar el 100% de los animales positivos a la infección, por lo tanto, se han desarrollado pruebas inmunodiagnósticas basadas en la detección de anticuerpos, antígenos o complejos inmunes. Su uso se ha ido generalizando cada vez más, ya que constituyen alternativas que ofrecen mayor sensibilidad, especificidad y celeridad en la obtención de resultados.

Al realizar un diagnóstico precoz en la etapa prepatente de la infección, es decir previo al período de eliminación de huevos del parásito, es posible realizar tratamientos oportunos tanto a los animales enfermos como al resto del rebaño, y así, evitar las consecuencias patógenas, productivas y económicas de esta parasitosis, como también la diseminación de la infección.

Entre los métodos inmunológicos la prueba de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ha sido usada en diversos estudios ofreciendo una adecuada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la fasciolosis.

En la eficiencia de estas técnicas es determinante la calidad de los antígenos a usar, ya que dada la estructura antigénica compleja de *F. hepatica*, al usar extractos crudos del parásito los resultados de sensibilidad obtenidos no han sido muy satisfactorios (Gorman *et al.*, 1991), debido a un número importante de reacciones inespecíficas o cruzadas con otros agentes parasitarios (Reddington *et al.*, 1984).

Con el fin de optimizar los resultados se han realizado estudios tendientes a identificar y seleccionar fracciones antigénicas de *F. hepatica* relevantes en el diagnóstico de la fasciolosis animal en nuestro país (Gorman *et al.*, 1995; Fredes *et al.*, 1997).

Una vez seleccionadas estas fracciones se han purificado o semipurificado para posteriormente, ser evaluadas enfrentándolas con sueros de animales infectados, mediante la técnica inmunológica de ELISA.

En el siguiente estudio se planteó evaluar, mediante la técnica de ELISA, el comportamiento de algunos antígenos purificados en el extranjero en cuanto a su eficiencia diagnóstica en animales infectados con *F. hepatica*.

REVISION BIBLIOGRAFICA

La fasciolosis o distomatosis es una enfermedad parasitaria producida por diversos tremátodos, siendo los géneros de mayor interés en medicina veterinaria *Fasciola* y *Fascioloides*, y dentro de éstos, las especies *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fascioloides magna* (Dunn, 1983).

F. hepatica es la especie más importante y sobre la cual se tiene mayor información, además es la única presente en nuestro país (Alcaíno y Apt, 1989). Este parásito es largo, aplanado, tiene forma de hoja, presenta órganos internos muy ramificados y puede llegar a medir al estado adulto 5 cm. de largo por 1,5 cm. de ancho. Es ovíparo y sus huevos son grandes (150 μm por 90 μm), ovalados, operculados y poseen un color crema característico (Dunn, 1983).

En su ciclo biológico presenta una gran cantidad de hospederos posibles, siendo frecuente en rumiantes, principalmente bovinos, ovinos y caprinos. Afecta además, a porcinos, equinos, lagomorfos y roedores, así como también al hombre.

En la especie humana, la fasciolosis es menos común en comparación con la infección animal, sin embargo se tiene información de 2.594 personas infectadas provenientes de 42 países (áreas) de Europa, América Latina, Norte de Africa y el Pacífico Oeste en un período de veinte años. Cuatro de estos casos son de chilenos (Chen y Mott, 1990).

Estudios en humanos a nivel nacional, han detectado un 13,8% de positividad a la intradermorreacción de un total de 2018 personas estudiadas en la provincia de Curicó (Apt *et al.*, 1988). Posteriormente entre los años 1989 y 1995, se ha descrito una prevalencia de infección en humanos de alrededor de un 0,7% en Linares, VII región (Morales *et al.*, 2000).

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo evolutivo de *F. hepatica* es indirecto, ya que necesita de un hospedero intermediario, que en Chile corresponde al caracol de agua dulce denominado *Limnaea (Galva, Pectinidens) viatrix* y un hospedero definitivo, mamífero herbívoro u omnívoro.

Las fasciolas adultas se ubican en los canalículos biliares del hospedero definitivo donde depositan sus huevos, los que junto con la bilis llegan al intestino para posteriormente ser eliminados al exterior con las heces. En el ambiente, en condiciones óptimas de temperatura (22° a 26°C) y alta humedad, se desarrolla entre 9 y 14 días, el miracidio. Si la temperatura es más baja el ciclo se alarga hasta cesar completamente a temperaturas bajo los 10°C (Alcaíno y Apt, 1989). Del huevo eclosiona una larva ciliada, el miracidio, el cual busca al hospedero intermediario para penetrarlo y transformarse en su interior en esporocisto, el que origina entre 5 a 8 redias, dando cada una nacimiento a numerosas cercarias (15 a 20), formas que después abandonan el caracol para enquistarse como

metacercarias en los vegetales haciéndose resistentes e infectantes. Los hospederos definitivos se infectan al consumir vegetales contaminados con metacercarias, que en el intestino se desenquistan, perforan la pared intestinal y vía peritoneal penetran el hígado a los 3 a 4 días de infección. Aquí, migran por el parénquima hepático produciendo gran destrucción tisular hasta alcanzar los conductos biliares donde al estado adulto, 4 semanas más tarde, van a producir huevos. El período mínimo de prepatencia de esta parasitosis es de 2 a 2,5 meses (Dunn, 1983).

DISTRIBUCION

La fasciolosis es una parasitosis mundialmente distribuida. A pesar de esto, se presenta con mayor frecuencia en localidades de clima templado debido a que tanto los diferentes estados larvarios del parásito como el caracol, requieren para su desarrollo temperaturas promedio mensuales superiores a los 10°C y alta humedad (Alcaíno y Apt, 1989).

En Chile, se presenta en todo el país, principalmente en las zonas comprendidas entre la IV y IX Región, siendo la VII Región hiperendémica. No se encuentra el parásito en la XII Región.

En la VII Región, a principios de la década de los noventa, existía una prevalencia de un 77,9% de los predios con animales infectados, de un total de

489 predios bovinos examinados (Alcaíno *et al.*, 1992). En estudios recientes en la región, se observan las siguientes tasas de infectividad: 85,7% para el ganado bovino, 16,4% para porcinos, 13,2% en ovinos 14,0% para caprinos y 37,3% en equinos. (Morales *et al.*, 2000)

PATOGENIA Y CUADROS CLINICOS

Las manifestaciones clínicas de la fasciolosis pueden ser muy variables, desde cuadros inaparentes hasta mortales, dependiendo del número de parásitos ingeridos, así como de sus estados evolutivos. Además, existen algunas especies que presentan una mayor resistencia a la infección, esto debido a mecanismos tisulares inespecíficos producidos por la propia estructura del tejido hepático más que por reacciones inmunológicas (Barriga, 1981). Es así, que ovinos, equinos, ratones y cuyes son las especies a las que se le ha descrito una menor resistencia. Los bovinos, hombre y ratas presentan una resistencia moderada, y los porcinos serían los más resistentes a la infección (Bautista, 1989). En los bovinos se ha descrito una reacción fibrótica que encapsula, destruyendo o aislando a un número importante de parásitos en su fase adulta o larvaria avanzada. El origen de esta resistencia en bovinos implica tanto barreras físicas como mecanismos inmunes específicos adquiridos (Hillyer y Soler de Galanes, 1988).

Cuadro agudo

Se presenta, principalmente, en la especie ovina. Causado por la ingesta de vegetales altamente contaminados por metacercarias, en un corto período de tiempo, y está dada por el paso de un gran número de fasciolas juveniles por el parénquima hepático (2 a 8 semanas de edad), lo que conlleva inflamación, destrucción tisular, hemorragias intensas, anemia y en los casos más graves muerte del animal. Esta forma clínica de la infección, al ser producida por los estados juveniles del parásito, aún inmaduros sexualmente (**fase prepatente**), no puede detectarse mediante el examen coprológico de rutina, sino solamente a través de la necropsia de los animales muertos, el estudio de enzimas celulares o mediante reacciones inmunológicas (Alcaíno y Apt, 1989).

Cuadro crónico

Este modo de presentación es menos severa y se presenta más comúnmente en bovinos, equinos y cerdos, está dado por un consumo constante y prolongado de un bajo número de metacercarias por períodos prolongados de tiempo, lo que permite la llegada de las fasciolas hasta los conductos biliares del hospedero provocando aquí distensión, engrosamiento, fibrosis y obstrucción. La presencia de los signos clínicos y severidad de ellos varía según la carga parasitaria, pero generalmente consisten en anorexia, pérdida de peso, debilidad, decaimiento, todo lo que repercute en su productividad (carne, leche, lana, etc). Esta forma clínica de la infección puede ser diagnosticada por exámenes coprológicos, pues los parásitos al ser adultos, producen huevos que son eliminados a través de los excrementos (**fase patente**).

DIAGNOSTICO

Para diagnosticar esta parasitosis existe una serie de alternativas que abarcan desde métodos semiológicos en terreno hasta modernas pruebas de laboratorio.

Los antecedentes epidemiológicos son importantes de considerar cuando se sospecha de infección por *F. hepatica*. Dentro de éstos, las condiciones climáticas dadas por la época del año son fundamentales debido a los requerimientos tanto de los estados evolutivos del parásito, así como también, del hospedero intermediario. La presencia de animales silvestres que actúan como reservorios y diseminadores de la infección como los roedores y lagomorfos, también pueden orientar en el diagnóstico.

Los signos clínicos que dependen de la fase de infección y de la carga parasitaria, generalmente son vagos e inespecíficos (como anorexia, debilidad, decaimiento, etc.) por lo tanto, por sí solos no sirven para diagnosticar la fasciolosis, pero acompañado de otros antecedentes pueden ser muy útiles. Además, mediante la necropsia de los animales muertos es posible observar un número variable de fasciolas dentro de los canalículos biliares, los que se encuentran dilatados, engrosados y fibrosados. También pueden evidenciarse lesiones en el tejido hepático, edemas subcutáneos, anemia y presencia de líquido sanguinolento en la cavidad abdominal (Alcaíno y Apt, 1989).

Otro procedimiento diagnóstico inespecífico, es el estudio de enzimas celulares a través de perfiles bioquímicos, que es un método sensible para determinar daño hepático. Las enzimas hepáticas, aspartato amino transferasa (AST) y deshidrogenasa glutámica (GLDH) incrementan significativamente sus niveles plasmáticos, debido a la destrucción celular provocada por la migración de las fasciolas inmaduras por el tejido hepático (fase prepatente), a los 40 y 60 días de infección respectivamente, hasta alcanzar sus niveles máximos a los 80 días, para luego disminuir progresivamente. A su vez, la enzima gama glutamil transferasa (GGT) eleva sus niveles séricos al máximo entre los 80 a 120 días de infección, lo que indicaría la penetración del parásito a los conductos biliares (Ferre *et al.*, 1994).

Es importante señalar que estas enzimas aumentan sus niveles plasmáticos, independiente de la causa de la agresión y daño al hígado, por lo tanto evidenciar un aumento de su actividad, no constituye un diagnóstico definitivo.

A través del hemograma también se pueden evidenciar alteraciones concomitantes con la fasciolosis, como la presencia de anemia normocrómica severa, leucocitosis, eosinofilia e hipoalbuminemia (Blood y Radostits, 1988).

Estos métodos demandan un alto costo y tiempo, por lo que no son de uso rutinario en poblaciones de animales de abasto.

El diagnóstico, tradicionalmente usado en animales vivos, es el examen coprológico de sedimentación que se basa en la detección de huevos de fasciolas adultas eliminados en las heces del hospedero. Es un método sencillo y de bajo costo, sin embargo, esta técnica no siempre logra pesquisar la infección y a veces requiere de repetidos exámenes para verificar la presencia de huevos, lo que sucede cuando la carga parasitaria es muy baja o cuando la eliminación de huevos suele ser intermitente, como se ha descrito en la especie equina (Owen, 1977).

Por otra parte, el examen coproparasitario es ineficiente cuando se trata de infecciones tempranas en que las fasciolas son aún juveniles y no producen huevos, ya que la eliminación de huevos por las fasciolas adultas se presenta recién a partir de la 10^o a 11^o semana de infección cuando ya el parásito ha causado el mayor daño al hospedero (Soulsby, 1988). Conviene señalar que también puede influir en los resultados, la frecuencia de defecación del hospedero, el ritmo de postura de huevos del parásito y la toma de muestra. Además, el análisis es por muestra individual, por lo tanto, en plantales numerosos el tiempo que demora es muy extenso.

Haciendo una comparación entre este método con la inspección *post mortem* de hígados ovinos, equinos y porcinos, se determinó que la sensibilidad del examen coprológico era de 72,5%, 83,3% y 76,6% respectivamente, de un total de 353 animales de matadero infectados (Gorman *et al.*, 1991).

Para superar las limitaciones del examen coprológico se ha estudiado el uso de pruebas inmunodiagnósticas, en su mayoría orientadas hacia la detección de anticuerpos específicos contra *F. hepatica* en los hospederos (Gorman, 1991; Hillyer, 1993). Estas técnicas ofrecen una mayor eficiencia en la detección temprana de infección, lo que permitirá efectuar una terapia oportuna impidiendo el efecto más patógeno de la etapa invasiva de la enfermedad. Se evita a su vez, que el parásito alcance el estado adulto y por lo tanto, se contribuye a disminuir la contaminación ambiental con sus huevos, hecho que adquiere una importancia epidemiológica. Además, dichos métodos son aplicables no sólo a nivel individual, sino también a nivel de masa, lo que contribuye a lograr un diagnóstico rápido y oportuno.

La fasciolosis induce en el hospedero una respuesta inmune mediada por células (respuesta celular) y la producción de anticuerpos específicos (respuesta humoral) que son reconocidos mediante el uso de las pruebas inmunológicas. La inmunidad contra este parásito es provocada tanto por las fasciolas juveniles, como por las formas adultas. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos precipitantes, aglutinantes, fijadores del complemento, etc. (Barriga, 1981).

Dentro de las pruebas inmunodiagnósticas se puede mencionar: hemoaglutinación indirecta (HAI), fijación del complemento (FC), doble difusión (DD), conrainmunolectroforesis (CIE), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoensayo en capa delgada (ICD) y prueba inmunoenzimática ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”).

La mayoría de estas pruebas permiten un diagnóstico temprano de la infección durante el período prepatente (Levine *et al.*, 1980; Farrell *et al.*, 1981; Hillyer *et al.*, 1985; Langley *et al.*, 1989; Gorman *et al.*, 1991). Es así que mediante pruebas de inmunoprecipitación (CIE y DD), se han detectado anticuerpos precipitantes entre la 2ª y 4ª semana de infección, tanto para infecciones naturales como para animales infectados experimentalmente, llegando al máximo entre la 6ª y 8ª semana (p.i.) para luego comenzar a disminuir (Levine *et al.*, 1980; Reddington *et al.*, 1984). Por lo tanto ambas pruebas (CIE y DD) son muy útiles para el diagnóstico de la fasciolosis aguda (Ouchterlony, 1978; Wenzel, 1990).

Se ha determinado que la HAI presenta mayor sensibilidad diagnóstica que CIE y DD en fasciolosis de ovinos, bovinos, equinos y porcinos, aunque en desmedro de su especificidad (Van Tiggele y Over, 1976; Gorman *et al.*, 1990; Gorman, 1991).

La IFI usada en ovinos y bovinos infectados experimentalmente, demostró un alza de anticuerpos a las 5 semanas p.i. (Hughes *et al.*, 1981). La prueba ELISA usada en infecciones naturales y experimentales en bovinos detectó anticuerpos a las 4 semanas p.i. (Farrell *et al.*, 1981).

Comparando los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos desde sueros ovinos, porcinos y equinos mediante ELISA, con los obtenidos por DD, CIE y HAI, se demostró que con ELISA fueron significativamente superiores (Gorman *et al.*, 1991).

La técnica inmunológica de ELISA ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de numerosas enfermedades de interés en medicina veterinaria. Es rápida y sencilla y permite el procesamiento de un importante número de muestras a la vez, recomendándose su utilización en estudios epidemiológicos de gran escala (Hillyer, 1986). Su eficiencia diagnóstica, al igual que la de cualquier otra prueba inmunodiagnóstica, va a depender estrechamente de la calidad del preparado antigénico que se emplee.

La prueba de ELISA ha sido ensayada en diversas especies animales incluyendo al hombre, y se ha determinado que es una prueba altamente sensible y específica en el diagnóstico de la fasciolosis (Zimmerman *et al.*, 1982; Hillyer, 1986; Gorman *et al.*, 1991), por lo que actualmente, es la prueba serológica más frecuentemente usada para la detección tanto experimental como natural de la fasciolosis (Farrell *et al.*, 1981; Santiago y Hillyer, 1988; Itagaki *et al.*, 1989; Pfister, 1990; Gorman *et al.*, 1991).

Esta técnica consiste en la detección y posterior cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos, por medio de la incubación de las muestras en estudio en microplacas en las que se adhiere el anticuerpo o antígeno específico. La formación del complejo antígeno-anticuerpo se visualiza mediante una reacción enzimática que, posteriormente, es medida en un lector automático o espectrofotómetro y expresada en unidades de densidad óptica (Morilla y Bautista, 1986).

F. hepatica presenta una composición antigénica compleja, definiéndose al parásito como un “mosaico antigénico”, por lo tanto, expone a los hospederos una gran cantidad y variedad de antígenos de naturaleza proteica, lipoproteica y glicoproteica (Reddington *et al.*, 1984). Estos pueden ser estructurales o somáticos (S) o bien, productos de secreciones glandulares o de excreción (E-S) (Farrell *et al.*, 1981). Incluso se ha descrito, que en el interior del organismo del hospedador, durante la migración, el parásito va experimentando cambios morfológicos y fisiológicos especialmente en su tegumento, y cada estado evolutivo presenta propiedades antigénicas diferentes, lo que dificulta el aislamiento de las fracciones antigénicas de interés diagnóstico (Hanna, 1980).

Dadas estas características del parásito, existen numerosos determinantes antigénicos compartidos con otros helmintos concomitantes en los hospederos, causando reacciones cruzadas o serológicas inespecíficas (Gorman *et al.*, 1991), lo que afecta la sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas. Es así, que estudios realizados en nuestro país, con extractos crudos del parásito y evaluados mediante la prueba inmunoenzimática de ELISA demuestran una sensibilidad y especificidad promedio de 61,6% y 71,7%, respectivamente en animales infectados, valores algo inferiores a los obtenidos con los exámenes coprológicos en las tres especies animales (ovinos, porcinos y equinos) que en promedio correspondió a 77,5% (Gorman *et al.*, 1991).

Más recientemente, Vargas *et al.*, (2001) usando antígenos E-S del parásito mediante ELISA, obtuvieron para la fasciolosis equina resultados de sensibilidad de 85,7% y de especificidad de 97,4%. Aún así, se hace necesario la detección e identificación de aquellas fracciones antigénicas con importancia diagnóstica para esta parasitosis, siendo la purificación de antígenos lo óptimo para mejorar notablemente los resultados obtenidos.

Es así, que extractos parasitarios de *F. hepatica*, tanto S como E-S, han sido analizados empleando electroforesis en geles de poliacrilamida bajo un ambiente reductor (SDS PAGE), lo que permite separar los distintos componentes proteicos de una muestra antigénica de acuerdo a su peso molecular. Los geles se someten posteriormente, a inmunoelectrotransferencia enzimática (EITB) o “Western blotting”ELISA a membranas de nitrocelulosa y trozos longitudinales de éstas se contactan con sueros de animales infectados, permitiendo la identificación de aquellas fracciones proteicas reconocidas por los hospederos infectados (Gorman *et al.*, 1992). Se han identificado una considerable cantidad de polipéptidos presentes en los preparados, un total de 48 en el antígeno S y 23 en el antígeno E-S, siendo los más destacados las bandas de 35-38, 30-33, 26-28 y 19-22 kDa (Gorman *et al.*, 1994, 1995). Estos resultados fueron similares a los señalados previamente por otros autores (Rivera *et al.*, 1988; Ruiz-Navarrete *et al.*, 1993).

Santiago y Hillyer (1986), empleando EITB, obtuvieron patrones de bandas inmunorreactivas similares en conejos, humanos y bovinos infectados. Los polipéptidos mayormente reconocidos por los animales infectados fluctuaban entre

los rangos de 31-33, 27-38, 18-23 y 11-14 kDa. Estos autores determinaron en 1988 que, tanto bovinos como ovinos, reconocen antígenos S de *F. hepatica* cuyos pesos moleculares (PM) varían en el rango de los 30-38 y 20-28 kDa desde alrededor de la octava semana p.i. (etapa prepatente).

A partir de sueros de personas infectadas, Mercado (1989), utilizando un extracto somático como antígeno, destacó tres grupos de bandas distribuidas entre 94 a 66; 43 a 36 y 35 a 14 kDa.

En otro estudio realizado en humanos, empleando EITB, se determinó que las fracciones inmunorreactivas de los antígenos E-S de PM aproximado de 38-40, 30-33 y 16-23 kDa, fueron muy relevantes por su especificidad, ya que no reaccionaron con sueros de pacientes infectados con hidatidosis, toxoplasmosis, enfermedad de Chagas, triquinosis, cisticercosis, toxocariasis y teniasis (Silva *et al.*, 2005).

Estudios más recientes en animales, empleando SDS-PAGE, han permitido determinar que a partir de antígenos S y E-S de fasciolas, existen fracciones proteicas más frecuentemente reconocidas sólo por ovinos con fasciolosis y, por lo tanto, muy relevantes desde el punto de vista diagnóstico. Estas fueron las de PM estimados de 16, 26-28, 35-36, 56-58 kDa (Gorman *et al.*, 1994, 1995). Algunas de las fracciones fueron, incluso, detectadas por los animales durante el período prepatente (26-28 y 35-36 kDa).

En sueros equinos y porcinos infectados naturalmente, la fracción más frecuentemente reconocida en los porcinos fue la de 22-30 kDa y en los equinos una banda similar de 25-30 kDa, ambas reconocidas por todos los sueros de los animales infectados. Otra fracción prominente y reconocida por más de la mitad de los sueros equinos y porcinos infectados fue la de 35-37 kDa (Gorman *et al.*, 1997).

En el caso del antígeno E-S, los resultados fueron similares, describiéndose polipéptidos cuyos pesos moleculares aproximados fueron de 14-17, 22-30, 35-39 y 40-42 kDa (Gorman *et al.*, 1997).

Una vez identificadas y caracterizadas las fracciones antigénicas relevantes para el diagnóstico, es importante proceder a la purificación de ellas con el objeto de evaluar su sensibilidad y especificidad en animales natural y experimentalmente infectados (Farrell *et al.*, 1981; Pfister, 1990; Ruiz-Navarrete *et al.*, 1993; Gorman *et al.*, 1995). Los procedimientos principalmente utilizados para este propósito son filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración (Cuperlovic, 1972), todas técnicas tendientes al aislamiento de material antigénico obtenido de extractos de fasciolas adultas.

En nuestro país, utilizando separación cromatográfica de exclusión por tamaño molecular, se ha identificado y semipurificado desde antígenos de *F. hepatica*, una importante fracción de PM estimado en ≤ 30 kDa, la que ensayada

mediante la prueba de ELISA, en diversas especies animales infectadas, señaló altos valores de sensibilidad y especificidad (Fredes *et al.*, 1997; Gorman *et al.*, 1997), superiores a los obtenidos con los extractos crudos del parásito.

En 1997 Fredes *et al.*, obtuvieron mediante EITB y ELISA una fracción de 29 kDa específica para la fasciolosis en ovinos, porcinos y equinos sanos, con otras parasitosis e infectados naturalmente, la cual ofreció valores de sensibilidad y especificidad de 94,5% y 93,5%, respectivamente, la que sería relevante en el inmunodiagnóstico. Esta fracción, sometida a SDS-PAGE y posterior EITB, evidenció la presencia de dos bandas de reconocimiento específico, de 29 y 14 kDa aproximadamente, siendo más concentrada la de 29 kDa, la cual purificada por cromatografía en una prueba de ELISA, empleada en bovinos, evidenció valores de sensibilidad y especificidad de 90% y 100%, respectivamente (Gorman *et al.*, 1998).

Empleando la electroelución, se purificaron dos proteínas de 14 y 29 kDa, que al ser analizadas mediante EITB en sueros ovinos con fasciolosis, se obtuvo una sensibilidad de 95% y 97,5%, respectivamente, y una especificidad del 100% en ambas (Fredes *et al.*, 2001). Luego, estas mismas proteínas fueron evaluadas a través de la prueba de ELISA en placa, obteniéndose valores de sensibilidad y especificidad de 94% y 98%, respectivamente para la proteína de 29 kDa, y valores de 60% y 100%, respectivamente para la proteína de 14 kDa (Fredes *et al.*, 2003).

Trabajos posteriores, lograron purificar mediante inmunoadsorción una fracción de 24-29 kDa. Esta fracción fue obtenida a partir de los productos de excreción-secreción (E-S) de fasciolas adultas que fueron fraccionados por cromatografía de filtración en gel, seguido de SDS-PAGE para identificar el eluido que contiene la fracción de 24-29 kDa. Con este polipéptido, se preparó un suero hiperinmune en conejos, que luego fue acoplado a una matriz de sefarosa para generar una columna cromatográfica de afinidad, que permitió la adsorción directa de esta fracción. Ésta, enfrentada a sueros humanos con fasciolosis y ovinos naturalmente infectados en la etapa prepatente y patente de la infección, demostró valores de sensibilidad de 91,6%, 93,3% y 80%, respectivamente, y 100% de especificidad para cada especie (Silva *et al.*, 2005).

Otros estudios, han determinado que dentro de los productos E-S, se encuentra una gran cantidad de enzimas proteolíticas secretadas, tanto por los ejemplares inmaduros que se encuentran migrando por el parénquima hepático, así como por el parásito adulto en los conductos biliares, siendo las más numerosas las del grupo cisteinil endopeptidasas (Dalton y Heffernan, 1989). Usando dos enzimas cisteína proteinasas de 26 kDa y 25 kDa purificadas desde productos E-S de fasciolas adultas, evaluadas mediante la prueba de ELISA para el diagnóstico de la fasciolosis humana, Córdova *et al.* (1999), obtuvieron valores de sensibilidad de 89% y 95%; y de especificidad de 98% y 100%, respectivamente.

Yamasaki *et al.* (1989), a partir de un extracto homogéneo de ejemplares adultos de *F. hepatica*, fueron los primeros en purificar y caracterizar mediante procedimientos cromatográficos una enzima cisteína proteinasa de PM aproximado de 27 kDa. Se determinó también, que esta enzima se localiza (a través de estudios inmunoquímicos), en los gránulos secretorios de las células del epitelio intestinal del parásito (Smith *et al.*, 1993b; Dalton *et al.*, 2003).

Esta enzima se empleó luego como antígeno en una prueba de ELISA, demostrando ser reconocida por el 100% de los pacientes humanos con fasciolosis (Yamasaki y Aoki, 1993). Posteriormente, se determinó que una de estas enzimas es una catepsina L, de peso molecular estimado de 27,5 kDa denominada CL1, capaz de fragmentar inmunoglobulinas y de prevenir *in vitro* la adherencia de células efectoras (tales como eosinófilos y macrófagos), a las fasciolas juveniles con el objeto de proteger a la fasciola del sistema inmune del hospedero (Smith *et al.*, 1993b; Carmona *et al.*, 1993), de modo similar al que lo hacen las catepsinas B y papaína, lo que produce la liberación de los fragmentos Fab y Fc de las inmunoglobulinas (Chapman y Mitchell, 1982; Berasaín *et al.*, 2000).

Recientemente, usando una procatepsina L recombinante (rproCL1), mediante la prueba de ELISA se evaluaron sueros humanos infectados con fasciolosis, con otras parasitosis e infectados con otras enfermedades no parasitarias, obteniéndose valores de sensibilidad y especificidad de 100% (Carnevale *et al.*, 2001).

A partir de los productos E-S de *F. hepatica*, se ha purificado otra catepsina L de peso molecular aparente de 29 kDa denominada CL2, la cual tiene la propiedad de dividir el fibrinógeno produciendo un coágulo, lo que podría prevenir un excesivo sangrado en zonas dañadas por el parásito (Dalton *et al.*, 1994). Esta proteinasa difiere de CL1 en su especificidad por sustratos fluorogénicos sintéticos, pH óptimo de actividad y secuencia N-terminal (Dowd *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que las proteasas presentes en los productos E-S de *F. hepatica*, y en especial CL1 y CL2 son capaces de producir la degradación de la matriz extracelular y de las moléculas de la membrana basal de los tejidos del hospedero (Berasaín *et al.*, 1997; Dalton *et al.*, 2003), para preparar el camino migratorio a las fasciolas juveniles produciendo la digestión de moléculas del hospedero, tales como el colágeno (Lonsdale-Eccles y Mpimbaza, 1986) y la hemoglobina, que otorga la nutrición del parásito en su fase migratoria (Rosenthal *et al.*, 1989).

También se ha trabajado, aunque con menor intensidad, en la descripción a partir de antígenos S y E-S de exopeptidasas, y dentro de este grupo se ha encontrado y descrito la presencia de actividad de aminopeptidasas desde extractos soluble-detergentes de fasciolas adultas (Acosta *et al.*, 1998).

Las aminopeptidasas pueden catalizar la hidrólisis de residuos de aminoácidos desde el extremo amino terminal de sustratos proteicos, además, participan en la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas y juega un rol importante en la regulación del metabolismo celular. Recientemente,

se ha purificado parcialmente, caracterizado y localizado histoquímicamente una leucina aminopeptidasa (LAP) de peso molecular estimado de 65 kDa, desde fasciolas adultas (Acosta *et al.*, 1998).

Actualmente, los estudios están dirigidos no sólo a la utilidad de estos antígenos enzimáticos en el inmunodiagnóstico de la fasciolosis, sino también al uso de éstos como vacunas contra ésta y otras parasitosis, de acuerdo a su importante rol en el hospedero, facilitando la migración parasitaria al ir degradando tejidos, proporcionando la alimentación y evadiendo el sistema inmune, además considerando que estas catepsinas son secretadas por todos los estados de desarrollo del parásito en el hospedero. Es así, como Hillyer (2005), sugiere el uso de ácidos grasos unidos a proteínas, catepsinas, hemoglobina y leucina aminopeptidasa de *F. hepatica*, como los potenciales candidatos para la elaboración de vacunas, contra fasciolosis y schistosomiasis dada la reacción y protección cruzada entre ambos parásitos.

Es así que se ha estudiado el nivel de protección contra fasciolosis en ovinos inmunizando de CL1, CL2 y LAP purificados desde parásitos adultos. En el primer grupo de animales, se estudió la respuesta a la vacunación con CL1 y CL2 separadamente, alcanzándose niveles de protección de 34% y 33%, y una reducción en producción de huevos de 70% y 81%, respectivamente. Luego, se empleó una combinación de las catepsinas L mezcladas en igual proporción, lo que arrojó un nivel de protección de 60% lo que sugiere un efecto sumatorio. En el segundo grupo, empleando CL1, CL2 y LAP se obtuvo un 78% lo cual es

significativamente protector. El tercer grupo alcanzó el mayor nivel al inmunizar solamente con LAP que evidenció un 89,6% de protección. En los dos últimos grupos de ovinos se evidenció una disminución del daño hepático, dado por un bajo nivel de enzimas gama-glutamil transferasa (GGT) (Piacenza *et al.*, 1999).

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento del inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Medir la eficiencia diagnóstica de antígenos enzimáticos purificados (leucina aminopeptidasa, catepsinas CL1 y CL2), a través de la prueba de ELISA en microplacas en ovinos, equinos y porcinos sanos y naturalmente infectados con *F. hepatica*.
- Comparar los resultados obtenidos entre estos antígenos y una fracción antigénica semipurificada de ≤ 30 kDa, previamente descrita en nuestro país, empleando los sueros detectores de animales sanos o infectados con el parásito, mediante ELISA.

MATERIAL Y METODOS

1. ANTIGENOS.

Se emplearon tres preparados antigénicos: Leucina aminopeptidasa (LAP) y Catepsinas L (CL1 y CL2) liofilizados, obtenidos desde la Unidad de Biología Parasitaria del Instituto de Higiene de Montevideo, Uruguay y proporcionadas por un integrante del grupo de investigadores de la Unidad, Carlos Carmona.

Además, se usó una fracción de ≤ 30 kDa obtenida en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1.1 Leucina aminopeptidasa (LAP)

Este antígeno fue obtenido desde extractos de membrana, somáticos y productos E-S de fasciolas adultas. La enzima fue parcialmente purificada por Acosta et al. (1998), mediante gel filtración y afinidad cromatográfica en Sepharosa EAH. Este material se reconstituyó en PBS (anexo 1) en un volumen de 600 μ l con una concentración proteica de 280 μ g/ μ l.

1.2 Catepsinas L proteinasas (CL1 y CL2)

Corresponde a antígenos enzimáticos obtenidos a partir de productos de excreción-secreción (E-S) de *F.hepatica*, los que fueron purificados utilizando una combinación de ultrafiltración con membranas YM3 (Amicón, Beverly, Massachusetts), cromatografía de gel filtración en Sephacryl S200-HR y cromatografía de intercambio iónico en QAE Sephadex A50 (Pharmacia, Uppsala,

Sweden), (Smith *et al.*, 1993 ; Dowd *et al.*, 1994). La reconstitución de los antígenos fue:

CL1 reconstituído en 600 μ l de PBS en concentración de 135 μ g/ μ l.

CL2 reconstituído en 600 μ l de PBS en concentración de 140 μ g/ μ l.

La mezcla CL1-CL2 se reconstituyó en 1 ml de PBS en concentración de 141 μ g/ μ l.

Las fracciones CL1 y CL2 en forma conjunta se analizaron en todas las especies animales, sin embargo, debido al menor material disponible los antígenos CL1 y CL2 se analizaron en forma separada solamente en las especies equina y porcina.

1.3 Fracción antigénica \leq 30 kDa

Las fasciolas adultas después de sucesivos lavados en solución salina isotónica estéril se incubaron en una solución Hedon-Fleig (anexo 1) en una proporción de una fasciola por 0,5 ml de solución, a 37°C, durante 18 hrs. El sobrenadante (antígeno E-S), se ultracentrifugó a 15.000 g por 20 minutos a 4°C, se dializó contra agua destilada (3 cambios) en agitación constante durante 18 hrs y luego se alicuotó y guardó a -70°C hasta su uso (Morilla y Bautista, 1986). Las fracciones antigénicas se obtuvieron mediante separación cromatográfica de exclusión por tamaño molecular. El antígeno E-S a volumen fijo, se filtró en una membrana de nitrocelulosa para luego ser colocado en una columna de Sephacryl S-300 de 2,5 cm de diámetro y 90 cm de largo (Sigma,MO,USA), en fase móvil de PBS 0,01M y azida 0,03% p/v,pH 7,2 con flujo continuo (anexo 1). Las diferentes

fracciones se recolectaron automáticamente en equipo Pharmacia (Uppsala, Sweeden) a longitud de onda de 280 nm (Lederer y Lederer, 1960).

Empleando la electroforesis en geles de poliacrilamida en ambiente reductor (SDS-PAGE) y posteriormente la inmunoelectrotransferencia (EITB), y sueros de ovinos detectores, se identificaron aquellos eluidos que contuvieran las fracciones de ≤ 30 kDa de reconocida relevancia diagnóstica y que se encontraban presentes en el 4º “peak” de la curva cromatográfica (Fredes *et al.*, 1997). Con estas fracciones se elaboró un “pool” cuya concentración proteica fue de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Bradford, 1976), el cual se almacenó en alicuotas a -70°C hasta su uso.

2. SUEROS

Se emplearon 90 sueros ovinos distribuidos en:

- 15 cursando la fase prepatente de la infección.
- 30 cursando la fase patente de la infección.
- 30 de animales sanos y negativos a la infección.
- 15 de animales negativos a la infección, pero positivos a hidatidosis.

Los sueros ovinos positivos, tanto patentes como prepatentes, fueron obtenidos a partir de infecciones naturales que se lograron mediante el traslado y ubicación de los animales en predios de la VII Región, donde la infección es altamente endémica (Alcaino y Apt, 1989).

Además se analizaron, 60 sueros de porcinos y 60 sueros de equinos, distribuídos así:

- 30 de cada especie eran positivos a la infección, condición comprobada en examen *post mortem* en mataderos.
- 30 de cada especie eran sanos y negativos a la infección, situación también comprobada mediante la inspección *post mortem* en mataderos.

Los sueros de animales negativos a la infección, que se utilizaron como controles de las tres especies, eran provenientes de animales de la XII Región, que tal como ha sido mencionado, es una Región libre de fasciolosis.

Las fracciones empleadas y las especies animales estudiadas se resumen en el siguiente cuadro (cuadro 1).

Cuadro 1: Fracciones antigénicas empleadas y especies animales estudiadas, mediante la prueba de ELISA.

Antígenos \ Especies	LAP	CL1-CL2	≤ 30 kDa	CL1	CL2
Ovinos prepatentes	Y	Y	Y		
Ovinos patentes	Y	Y	Y		
Porcinos	Y	Y	Y	Y	Y
Equinos	Y	Y	Y	Y	Y

3. TECNICA

3.1 ELISA en microplacas

Esta prueba se realizó en microplacas de poliestireno (Nunc, Lab. Intermed, Demark) de fondo plano de 96 pocillos (12 por 8). Las placas fueron incubadas con 100 µl de cada fracción antigénica por pocillo, diluyendo el antígeno en buffer carbonato, pH 9,6 a una concentración de 4 µg/ml, según estudios anteriores (anexo 1)(Fredes *et al.*, 1997).

La incubación se hizo por 3 hrs. a 37°C y posteriormente por toda la noche a 4°C, en agitación constante. Después de lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con PBS-T20 (buffer fosfato salino/Tween 20) al 0,05%, pH 7,2, se bloquearon los sitios activos remanentes por 1 hora a 4°C con una solución de PBS-T20 y leche descremada al 3% (PBS-T20-L), en cámara húmeda (anexo 1). Se lavaron nuevamente con PBS-T20 tres veces, se estilaron y sellaron para ser guardadas a -20°C hasta su posterior uso.

La dilución óptima de los sueros se determinó empleando sueros controles positivos y negativos a fasciolosis de las diferentes especies, y se escogió aquella que ofreció la mayor diferencia de densidad óptica (DO) entre ellos. Los sueros ovinos, porcinos y equinos fueron diluïdos en solución PBS-T20-L, a una proporción de 1/64, depositando 100µl por pocillo durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda y agitación, luego de 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T20, para eliminar los anticuerpos no adheridos. Las placas fueron incubadas con

el segundo anticuerpo o conjugado (inmunoglobulina anti-IgG especie-específica, unida a peroxidasa, Sigma) (anexo 2), en dilución de 1/4000 en PBS-T20, depositando 100µl de conjugado por pocillo. Se incubó por 1 hora a 37°C en agitación y después se lavaron 3 veces con PBS-T20.

El revelado se llevó a cabo agregando 100µl de sustrato por pocillo (anexo 1) e incubando a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 a 15 minutos. La reacción se detuvo al adicionar 25µl de ácido sulfúrico 2,5M por pocillo. Las lecturas de DO se realizaron en un lector automático de ELISA a 492 nm.

Los sueros se analizaron en duplicado y se usó el promedio de sus DO, considerando como positivos a aquellos sueros cuyas DO fueran mayores al doble de las DO promedio de los tres controles negativos (“cut off”) que se incluyeron en cada placa (OIEA, 1989).

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA y en el examen *post mortem* fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Mc Nemar para proporciones dependientes (Remington y Schorck, 1970).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos, en la prueba de ELISA, empleando el antígeno Leucina aminopeptidasa (LAP) enfrentado a sueros de ovinos sanos e infectados con *F. hepatica* (en fase prepatente y patente), y el examen *post mortem*, demostraron una sensibilidad de 86,7% y 93,3%, respectivamente, y una especificidad de 86,7% en ambos casos. El valor predictivo positivo, que corresponde a la probabilidad que un individuo positivo a la prueba esté realmente infectado, fue de 76,5% y 87,5%, respectivamente, y el valor predictivo negativo, probabilidad que un individuo negativo a la prueba no esté infectado, fue de 92,9% en ambos casos (cuadro 2). Estos resultados se obtuvieron empleando como valor de corte o “cut off” la densidad óptica (D.O.) de 0,52.

En tanto en la especie porcina y equina, para esta misma fracción (LAP), se presentaron valores de sensibilidad de 56,7% y 3,3%, y especificidad de 90% y 100%, respectivamente. El valor predictivo positivo fue de 85% y 1%, y el negativo 67,5% y 50,8%, respectivamente (cuadro 3). Esta vez, el valor “cut off” fue la D.O. de 0,67 y 0,83, respectivamente.

Empleando los antígenos enzimáticos Catepsinas L (CL1 y CL2) asociados en un mismo preparado (CL1+CL2), enfrentados a los sueros ovinos sanos e infectados con *F. hepatica* (en fase prepatente y patente), comparando la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, los resultados de sensibilidad fueron respectivamente, 20% y 16,7%. La especificidad fue de 76,7% y 73,3%,

respectivamente. En tanto, el valor predictivo positivo fue de 20% y 38,5% para la infección prepatente y patente, respectivamente. El valor predictivo negativo fue de 62,9% y 46,8%, respectivamente (cuadro 4). Como valor “cut off” se usó la D.O. de 0,76 en ambos casos.

Comparando la misma fracción antigénica (CL1+CL2), en porcinos sanos e infectados con *F. hepatica*, se obtuvieron valores de sensibilidad de 10%, especificidad de 96,7%, valor predictivo positivo de 75% y negativo de 51,8%. En la especie equina los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 0% y 100%, respectivamente, mientras que el valor predictivo positivo fue de 0% y el valor predictivo negativo fue de 50% (cuadro 5). Se empleó como valor “cut off” la D.O. de 1,55 y 1,02, respectivamente.

En el caso de la fracción antigénica de peso molecular ≤ 30 kDa, empleando sueros ovinos de animales sanos e infectados con fasciolosis, comparando la prueba de ELISA con el examen *post mortem*, se determinó que los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, en la fase prepatente de la infección, fueron de 80%, 93,3%, 85,7% y 90%, respectivamente, mientras que en la fase patente fueron 93,3%, 96,6%, 96,6% y 93,5%, respectivamente (cuadro 6). En tanto, para la especie porcina y equina los resultados de sensibilidad obtenidos fueron de 90% y 80%, y la especificidad fue de 83,3% y 90%, respectivamente. Los valores predictivos, tanto positivo como negativo, obtenidos fueron de 84,3% y 89,2% en los sueros porcinos y 88,9% y 81,8% en los equinos (cuadro 7).

Empleando el antígeno CL1 por separado, enfrentado a sueros porcinos y equinos sanos e infectados con fasciolosis, los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron de 46,7% y 86,7%, respectivamente para porcinos, y 3,3% y 100%, respectivamente para equinos. Los valores predictivos positivos para ambas especies, respectivamente, fueron 77,8% y 1%. Los valores predictivos negativos fueron de 61,9% para porcinos y 50,8% para equinos (cuadro 8). Los valores de “cut off” fueron la D.O. de 0,54 y 0,43, respectivamente.

Los resultados que se obtuvieron, empleando el antígeno CL2 por separado, enfrentado a sueros porcinos y equinos, de animales sanos e infectados con *F. hepatica*, comparando la prueba de ELISA con el examen *post mortem*, fueron de 66,7% y 0% de sensibilidad, y 90% y 100% de especificidad, respectivamente; valor predictivo positivo 87% y 0%, y valor predictivo negativo 73%, para porcinos y 50% para equinos (cuadro 9). Los valores “cut off” fueron la D.O. de 0,54 y 0,40, respectivamente.

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos con las diferentes fracciones antigénicas en la especie ovina, porcina y equina en el presente estudio se resumen en el cuadro 10.

A través de la prueba de Mc Nemar, se estableció que empleando el antígeno LAP en la especie ovina, durante la fase prepatente y patente de la infección, no hubo diferencias diagnósticas significativas entre el examen *post mortem* y la prueba de ELISA ($p > 0,05$), es decir su eficiencia diagnóstica es similar

y por lo tanto alta. Lo mismo se determinó al emplear la fracción de ≤ 30 kDa en las tres especies animales estudiadas ($p > 0,05$).

Sin embargo, los resultados empleando la fracción CL1+CL2 enfrentada a sueros ovinos, no fueron satisfactorios ya que ofreció diferencias entre el examen *post mortem* y la prueba de ELISA en la etapa prepatente de la infección ($p \leq 0,05$). Lo mismo ocurrió en el caso del antígeno CL2 en la especie porcina, el antígeno LAP y CL1+CL2 en las especies porcina y equina ($p \leq 0,05$).

Cuadro 2: Distribución de los sueros de ovinos sanos e infectados con *Fasciola hepatica* (en fase prepatente y patente), según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando el antígeno **Leucina aminopeptidasa (LAP)**.

	Infección Prepatente			Infección Patente		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	13	4	17	28	4	32
Elisa -	2	26	28	2	26	28
Total	15	30	45	30	30	60

Sensibilidad:	86,7 %	93,3 %
Especificidad:	86,7 %	86,7 %
Valor Predictivo (+):	76,5 %	87,5 %
Valor Predictivo (-):	82,9 %	92,9 %

Cuadro 3: Distribución de los sueros de porcinos y equinos sanos e infectados con *Fasciola hepatica*, según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando el antígeno **LAP**.

	Porcinos			Equinos		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	17	3	20	1	0	1
Elisa -	13	27	40	29	30	59
Total	30	30	60	30	30	60

Sensibilidad:	56,7 %	3,3 %
Especificidad:	90 %	100 %
Valor Predictivo (+):	85 %	1 %
Valor Predictivo (-):	67,5 %	50,8 %

Cuadro 4: Distribución de los sueros ovinos sanos e infectados con *Fasciola hepatica* (en fase prepatente y patente), según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando los antígenos **catepsinas CL1+CL2**.

	Infección Prepatente			Infección Patente		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	3	7	10	5	8	13
Elisa -	12	23	35	25	22	47
Total	15	30	45	30	30	60

Sensibilidad:	20 %	16,7 %
Especificidad:	76,7 %	73,3 %
Valor Predictivo (+):	20 %	38,5 %
Valor Predictivo (-):	62,9 %	46,8 %

Cuadro 5: Distribución de los sueros de porcinos y equinos sanos e infectados con *Fasciola hepatica*, según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando los antígenos **CL1+CL2**.

	Porcinos			Equinos		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	3	1	4	0	0	0
Elisa -	27	29	56	30	30	60
Total	30	30	60	30	30	60

Sensibilidad:	10 %	0 %
Especificidad:	96,7 %	100 %
Valor Predictivo (+):	75 %	0 %
Valor Predictivo (-):	51,6 %	50 %

Cuadro 6: Distribución de los sueros ovinos sanos e infectados con *Fasciola hepatica* (en fase prepatente y patente), según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando la fracción de ≤ 30 kDa.

	Infección Prepatente			Infección Patente		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	12	2	14	28	1	29
Elisa -	3	28	31	2	29	31
Total	15	30	45	30	30	60

Sensibilidad:	80 %	93,3 %
Especificidad:	93,3 %	96,6 %
Valor Predictivo (+):	85,7 %	96,6 %
Valor Predictivo (-):	90 %	93,5 %

Cuadro 7: Distribución de los sueros porcinos y equinos, sanos e infectados con *Fasciola hepatica*, según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando la fracción de ≤ 30 kDa.

	Porcinos			Equinos		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	27	5	32	24	3	27
Elisa -	3	25	28	6	27	33
Total	30	30	60	30	30	60

Sensibilidad:	90 %	80 %
Especificidad:	83,3 %	90 %
Valor Predictivo (+):	84,3 %	88,9 %
Valor Predictivo (-):	89,2 %	81,8 %

Cuadro 8: Distribución de los sueros de porcinos y equinos, sanos e infectados con *Fasciola hepatica* (en fase prepatente), según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando el antígeno **CL1**.

	Porcinos			Equinos		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	14	4	18	1	0	1
Elisa -	16	26	42	29	30	59
Total	30	30	60	30	30	60

Sensibilidad:	46,7 %	3,3 %
Especificidad:	86,7 %	100 %
Valor Predictivo (+):	77,8 %	1 %
Valor Predictivo (-):	61,9 %	50,8 %

Cuadro 9: Distribución de los sueros de porcinos y equinos, sanos e infectados con *Fasciola hepatica*, según la prueba de ELISA y el examen *post mortem*, empleando los antígenos **CL2**.

	Porcinos			Equinos		
	Examen <i>post mortem</i> Nº			Examen <i>post mortem</i> Nº		
	Infectados	Sanos	Total	Infectados	Sanos	Total
Elisa +	20	3	23	0	0	0
Elisa -	10	27	37	30	30	60
Total	30	30	60	30	30	60

Sensibilidad:	66,7 %	0 %
Especificidad:	90 %	100 %
Valor Predictivo (+):	87 %	0 %
Valor Predictivo (-):	73 %	50 %

Cuadro 10: Valores de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA, en el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, porcinos y equinos, empleando las fracciones antigénicas **LAP, CL1, CL2 y ≤ 30 kDa**.

Antígenos Especies	% Sensibilidad					% Especificidad				
	LAP	CL1 + CL2	≤ 30 kDa	CL1	CL2	LAP	CL1 + CL2	≤ 30 kDa	CL1	CL2
Ovinos prepatentes	86,7	20	80			86,7	76,7	93,3		
Ovinos patentes	93,3	16,7	93,3			86,7	73,3	96,6		
Porcinos	56,7	10	90	46,7	66,7	90	96,7	83,3	86,7	90
Equinos	3,3	0	80	3,3	0	100	100	90	100	100

DISCUSIÓN

Las técnicas basadas en la detección de anticuerpos constituyen una buena alternativa para el diagnóstico de la fasciolosis y en este caso, la facilidad de obtención de antígenos al tratarse de parásitos de gran talla constituye una ventaja. Se destaca además que es posible con estos procedimientos diagnósticos detectar la infección precozmente y ser aplicables a una gran cantidad de muestras (Hillyer, 1993; Gorman *et al.*, 1995).

Según una serie de trabajos realizados, es posible afirmar que el inmunodiagnóstico de la fasciolosis empleando en particular la prueba de ELISA, ofrece una alta eficiencia en cuanto a sensibilidad, especificidad, celeridad de los resultados y el análisis de una alta cantidad de muestras (Zimmerman *et al.*, 1982; Hillyer *et al.*, 1985; Muñoz *et al.*, 1986; Gorman *et al.*, 1991). Dada la complejidad proteica y antigénica de *F. hepatica*, es esencial disponer de un material antigénico en concentración adecuada y de calidad (Coltorti, 1986; Muñoz *et al.*, 1986; Gorman *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 1995). Es por esta razón, que la purificación de antígenos específicos y relevantes, y su posterior análisis y aplicación en el diagnóstico de esta parasitosis, constituyen procedimientos útiles y necesarios (Fredes *et al.*, 1997, 2001, 2003; Gorman *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005).

En el presente estudio se emplearon antígenos purificados, descritos previamente por investigadores por constituir moléculas de alto interés en el

inmunodiagnóstico de esta parasitosis, una Leucina aminopeptidasa (LAP) y dos Catepsinas L (CL1 y CL2), obtenidos desde extractos de membrana, somáticos y productos E-S, mediante métodos de filtración y posterior cromatografía, los que expuestos a sueros de ovinos, porcinos y equinos sanos e infectados naturalmente con *F. hepatica*, evidenciaron resultados variables.

Al analizarlos, se pudo advertir que la fracción enzimática LAP fue la que presentó mayor eficiencia pues demostró valores elevados de sensibilidad y especificidad para la especie ovina tanto cuando la infección por *F. hepatica* es aún prepatente (86,7%) como también cuando la infección es patente (93,3% y 86,7%, respectivamente). La eficiencia fue similar al examen *post mortem* ($p > 0,05$) por lo tanto, puede considerarse que se trata de una fracción altamente recomendable para el diagnóstico de fasciolosis ovina. La revisión de la literatura permitió advertir la existencia de referencias solamente relacionadas al valor vaccinal de esta fracción y no en relación a su uso como fracción diagnóstica.

Los resultados que se lograron con la fracción LAP fueron muy comparables con los obtenidos en el presente análisis con la fracción de ≤ 30 kDa, la que enfrentada a los mismos sueros ovinos, demostró valores de sensibilidad y especificidad similares para la fase prepatente de 80% y 93,3%, y para la fase patente de 93,3% y 96,6%, respectivamente no evidenciándose diferencias con el examen *post mortem* ($p > 0,05$). Sin embargo, no sucedió lo mismo al enfrentar este antígeno (LAP), a los sueros porcinos y equinos, ya que los resultados obtenidos

fueron insatisfactorios con un valor de sensibilidad algo superior al 50% en porcinos y un resultado claramente deficiente (33%) en equinos.

Las fracciones CL1 y CL2 fueron estudiadas en forma asociada en las tres especies animales, lográndose estudiar en forma separada sólo en equinos y porcinos debido a la escasez del material, como se mencionase anteriormente.

Los resultados obtenidos con los antígenos CL1 y CL2, enfrentados a los sueros de las tres especies animales en estudio (tanto estudiados en forma asociada en un solo preparado como por separado), demostraron resultados muy poco satisfactorios, con baja sensibilidad y por lo tanto, con escasa relevancia diagnóstica. Estos resultados llaman la atención, pues no es concordante con lo señalado por Yamasaki *et al.*, (1989) y posteriormente por otros autores (Yamasaki y Aoki, 1993; Heussler y Dobbelaere, 1994; Ruiz *et al.*, 2003), quienes lograron purificar y evaluar, mediante ELISA, una catepsina proteinasa de 27 kDa, que debería corresponder a la misma enzima usada en este trabajo, la que demostró ser específica y relevante para diagnosticar fasciolosis humana y animal.

Aún más, Fredes *et al.*, (1997, 2001), empleando una fracción cromatográfica de 29 kDa mediante EITB y posterior ELISA, obtuvieron altos valores de sensibilidad y especificidad en sueros de las tres especies animales en estudio (ovinos, porcinos y equinos) fracción que podría corresponder a los antígenos CL1 y CL2 empleados en el presente trabajo.

Similarmente otros estudios también indican que una fracción semipurificada de antígenos S y E-S de 22-30 kDa, es de alta eficiencia en la detección de anticuerpos de porcinos y equinos infectados con *F. hepatica* (Santiago y Hillyer, 1988; Gorman *et al.*, 1997). Una similar fracción al ser purificada por inmunoadsorción demostró también, una alta sensibilidad y especificidad en el inmunodiagnóstico de fasciolosis humana y ovina (Silva *et al.*, 1993; Gorman *et al.*, 1995; Fredes *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005). Es decir, es probable que esta fracción de 22-30 kDa, reconocida como muy sensible y específica en estos estudios, sea correspondiente a la catepsina proteinasa CL1 y CL2 (Yamasaki *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1993b; Ruiz *et al.*, 2003).

Los resultados de eficiencia diagnóstica obtenidos con las fracciones CL1 y CL2 en el presente trabajo, no fueron los esperados, ya que demostraron baja sensibilidad y especificidad en las tres especies estudiadas. Intentando lograr una probable explicación podría señalarse el hecho de que la cisteína proteinasa es una enzima que presenta gran labilidad a la purificación lo que provoca una disminución en su eficiencia antigénica (Smith *et al.*, 1993b). Por otra parte, el tiempo de almacenaje de los productos liofilizados, que correspondió aproximadamente a 6-8 meses, así como el tiempo empleado en la realización del presente estudio, que se extendió por aproximadamente a dos años, también pueden haber tenido un efecto negativo afectando los resultados diagnósticos obtenidos.

Debe además tenerse presente que las proteínas al estado nativo presentan una conformación espacial determinada (estructura cuaternaria), y que por lo tanto al ser sometida en el proceso de purificación a diferentes agentes, tanto físicos (cambios de temperatura, de presión, irradiación, fraccionamiento, filtración, campos eléctricos) como químicos (cambios de pH, solventes, detergentes), determinan alteraciones (Leverton y Odell, 1985). Se señala por ejemplo, una pérdida de la conformación espacial y estructural, transformándose la estructura típica de ella en otra más desordenada. Además, su actividad biológica (enzimas y hormonas) y sus propiedades antigénicas pueden afectarse al modificarse los diversos epítopes expuestos (desnaturalización de las proteínas) (Pennacchiotti, 1998).

Por otra parte, la efectividad de los ensayos realizados mediante la técnica de ELISA en el presente estudio, queda claramente demostrada por los resultados que se obtuvieron con los sueros controles en las tres especies en estudio, pues éstos fueron totalmente coincidentes con su condición, es decir, los sueros de los infectados dieron lecturas positivas y los animales sanos respondieron en forma negativa.

Además, si analizamos los resultados de sensibilidad y especificidad demostrados por la fracción antigénica de ≤ 30 kDa en el presente estudio con estudios anteriores, éstos fueron superiores (Gorman *et al.*, 1991; Fredes *et al.*, 1997). Es importante destacar que los resultados que se obtuvieron con esta

fracción, permiten comprobar que la implementación de la prueba de ELISA fue adecuada y eficiente.

Los diversos estudios que han sido comparados con el presente trabajo, si bien demostraron similitudes, también ofrecieron diferencias en la eficiencia de la detección de anticuerpos. Es importante considerar, que se han utilizado diferentes modelos animales, por lo que las diferencias de reconocimiento inter especie, se puede atribuir a diferentes poblaciones de anticuerpos que se generan durante la infección en las distintas especies estudiadas.

Por su parte, los resultados de los valores predictivos, tanto positivo como negativo, presentaron un comportamiento similar a lo observado con los valores de sensibilidad y especificidad, así el antígeno LAP en ovinos y porcinos demostró resultados cercanos al 90%, y por lo tanto satisfactorios desde el punto de vista diagnóstico. Lo mismo se puede señalar sobre los valores obtenidos usando el antígeno CL2 (separadamente), con los sueros porcinos. Mientras que con la fracción antigénica de ≤ 30 kDa, los valores predictivos obtenidos en las tres especies animales en estudio, fueron altos y superiores a los obtenidos en estudios previos, demostrando alta relevancia en el inmunodiagnóstico de esta parasitosis.

CONCLUSIONES

- Se comprueba nuevamente que la técnica inmunológica de ELISA es una prueba confiable y eficaz en el diagnóstico de la fasciolosis.
- De las fracciones antigénicas enzimáticas empleadas en este trabajo, el antígeno Leucina aminopeptidasa (LAP) y la fracción de ≤ 30 kDa fueron las que demostraron mayor relevancia inmunodiagnóstica en la infección por *Fasciola hepatica*.
- Las fracciones CL1 y CL2 no fueron eficientes para diagnosticar la infección, ya que su labilidad y manejo posterior, pudo haber influido en este resultado.
- Se ratifica, una vez más, el valor diagnóstico de la fracción antigénica de ≤ 30 kDa, obtenida desde productos E-S de *F. hepatica*, en las tres especies animales usadas en este estudio (ovinos, porcinos y equinos).

BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA, D; GOÑI, F.; CARMONA, C. 1998. Characterization and partial purification of a membrane associated leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 84: 62-68p.
- ALCAINO, H; APT, W. 1989. Algunos antecedentes sobre la fasciolosis animal y humana. Monog. Med. Vet. 11: 14-29.
- ALCAINO, H.; APT, W.; VEGA, F.; GORMAN, T.; APT, P. 1992. Fasciolosis animal en la VII Región de Chile: áreas de distribución e infección en caballos y conejos silvestres. Parasitol. al Día 16: 11-16.
- APT, W.; KLEIN, P.; VEGA, F.; ALCAINO, H.; RETAMAL, C. 1988. Fasciolosis humana en la población rural de la provincia de Curicó (VII Región), Chile. Parasitol. al Día. 12: 155-164.
- BARRIGA, O. 1981. The immunology of parasitic infections. University Park Press, Baltimore. 354p.
- BAUTISTA, C.R. 1989. Inmunología de la fasciolosis. En: Inmunología Veterinaria. Morilla, A. De. Diana, S.A. de C.V. México. 1ª Ed. pp. 243-261.
- BERASAIN, P.; GOÑI, F.; Mc GONIGLE, S.; DOWD, A.; DALTON, J.P.; FRANGIONE, B.; CARMONA, C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. J. Parasitol. 83: 1-5.

- BERASAIN, P.; CARMONA, C.; FRANGIONE, B.; DALTON, J.P.; GOÑI, F. 2000. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp. Parasitol.* Feb; 94: 99-110.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. 1988. *Medicina Veterinaria*. 6ª Ed. Edit. Interamericana, México, D.F. pp. 986-991.
- 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.
- CARMONA, C; DOWD, A.J.; SMITH, A.M.; DALTON, J.P. 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juvenils. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 9-18.
- CARNEVALE, S.; RODRIGUEZ, M.I.; GUARNERA, E.A.; CARMONA, C.; TANOS, T.; ANGEL, S.O. 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* Sep-Oct; 41: 43-9.
- COLTORTI, E. 1986. Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 1000-1005.
- CORDOVA, M.; REATEGUI, L.; ESPINOZA, J.R. 1999. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Jan-Feb; 93: 54-7.

- CUPERLOVIC, K. 1972. Metabolic antigen of *Fasciola hepatica* in immunodiagnosis of fascioliasis. Acta Vet., Beograd. 22: 219-222.
- CHAPMAN, C.; MITCHELL, G. 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. 11: 165-178.
- CHEN, M.G.; MOTT, K.E. 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: A review of recent literature. Trop. Diseases Bul. 87: 38p.
- CHILE, 1989. Ministerio de salud. Información estadística de las principales enfermedades registradas en los animales domésticos beneficiados en los mataderos del país. Ord. Nro. 5877.
- DALTON, J.P.; HEFFERNAN, M. 1989. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. Mol. Biochem. Parasitol. 35: 161-166.
- DALTON, J.P.; DOWD, A.J.; CARMONA, C. 1994. Cathepsin L proteinase secreted by the parasite trematode *Fasciola hepatica*. In Biology of parasitism, (R.Erich, and A. Nieto eds.). Trilce, Montevideo, Uruguay, pp 9-23.
- DALTON, J.P.; NEILL, S.O.; STACK, C.; COLLINS, P.; WALSH, A.; SEKIYA, M.; DOYLE, S.; MULCAHY, G.; HOYLE, D.; KHAZNADJI, E.; MOIRE, N.; BRENNAN, G.; MOUSLEY, A.; KRESHCHENKO, N.; MAULE, A.G.; DONNELLY, S.M. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, generation liver fluke vaccines. Int. J. Parasitol. 33: 1173-81.
- DOWD, A.J.; Mc GONIGLE, S.; SMITH, A.M.; DALTON, J.P. 1994. Characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. Eur. J. Biochem. 223: 91-98.

- DUNN, A. 1983. Helminología Veterinaria. 2ª Edición. México, D.F., Edit. El Manual Moderno S.A. 112-137p.
- FARREL, L.C.J.; SHEN, D.T.; WESCOTT, R.B.; LANG, B.Z. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. Am. J. Vet. Res. 42: 237-240.
- FERRE, Y.; BARRIO, J.P.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ROJO-VAZQUEZ, F.A. 1994. Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. 55: 71-79.
- FREDES, F.; GORMAN, T.; SILVA, M.; ALCAINO, H. 1997. Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de *Fasciola hepatica* mediante Western Blot y ELISA en animales infectados. Arch. Med. Vet. 29: 283-294.
- FREDES, F.; SANCHEZ, C.; GORMAN, T.; ALCAINO, H. 2001. Purificación de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante electroelución y su aplicación inmunodiagnóstica en la infección animal. Parasitol. al Día. 25: 19-23.
- FREDES, F.; ALARCON, J.; ILABACA, P.; ALCAINO, H. 2003. Evaluación diagnóstica de dos proteínas purificadas de *Fasciola hepatica* mediante ELISA en la fasciolosis ovina. Parasitol. Latinoam. 58: 148-151.
- GORMAN, T.; WENZEL, J.; LORCA, M.; IBARRA, L.; SAN MARTIN, B.; ALCAINO, H. 1990. Pruebas de inmunoprecipitación y hemoaglutinación indirecta en el diagnóstico de la fasciolosis ovina. Parasitol. al Día. 15: 87-93.
- GORMAN, T. 1991. Inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal. Parasitol. al Día 15: 37-42.

- GORMAN, T; MORENO, P.; LORCA, M.; IBARRA, L.; ALCAINO, H. 1991. Inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunodiagnóstica (ELISA). *Parasitol. al Día*. 15: 87-93.
- GORMAN, T.; CONCHA, V.; ALCAINO, H.; FREDES, F.; GONZALEZ, H.; FERREIRA, A. 1992. Caracterización de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante inmunoprecipitación en agarosa. *Parasitol. al Día*. 16: 81-86.
- GORMAN, T.; CONCHA, V.; FREDES, F.; FERREIRA, A.; VALDES, A.; ALCAINO, H. 1994. Detección de antígenos de interés diagnóstico en infecciones animales por *Fasciola hepatica*. *Parasitol. al Día*. 18: 26-32.
- GORMAN, T; VALDES, A.; FREDES, F.; FERREIRA, A.; ALCAINO, H. 1995. Reconocimiento antigénico de ovinos naturalmente infectados con *Fasciola hepatica*, monitoreado a través de inmunoelectrotransferencia enzimática (Western Blotting). *Arch. Med. Vet.* 27: 33-40.
- GORMAN, T; ABALLAY, J.; FREDES, F.; SILVA, M.; AGUILLON, J.C.; ALCAINO, H. 1997. Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using Western blots. *Int. J. Parasitol.* 27: 1429-1432.
- GORMAN, T.; SANCHEZ, R.; FREDES, F.; ALCAINO, H. 1998. Inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina mediante ELISA y Western Blot. *Parasitol. al Día*. 22.
- HANNA, R. 1980. *Fasciola hepatica*: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Exp. Parasitol.* 50: 155-170.

- HEUSSLER, V.; DOBBELAERE, A.E. 1994. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64: 11-23.
- HILLYER, G. 1986. Fascioliasis, paragonimiasis, clonorchiasis and opistorchiasis. In.: *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases*. Ed. Walls and Schantz: 609-617.
- HILLYER, G. 1993. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. *Parasitol. al Día*. 17: 130-136.
- HILLYER, G. 2005. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J. Helminthol.* 79(3): 241-7.
- HILLYER, G.; SANCHEZ, Z.; DE LEON, D. 1985. Immunodiagnosis of bovine fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation methods. *J. Parasitol.* 71: 449-454.
- HILLYER, G.; SOLER DE GALANES, M. 1988 Identification of a 17 kDa *Fasciola hepatica* immunodiagnostic antigen by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2048-2053.
- HUGHES, D.; HANNA, R.; DOY, T. 1982. Antibody response in cattle, sheep and rats to infection with irradiated metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 32: 354-358.
- ITAGAKI, T.; OHTA, Y.; ISO, H.; KONISHI, M.; CHINONE, S.; ITAGAKI, H. 1989. Diagnosis of *Fasciola sp.* Infections in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51: 757-764.
- LANGLEY, R.; HILLYER, G. 1989. Detection of circulating immune complexes by the enzyme-linked immunosorbent assay in sera from cattle infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 75: 690-695.

- LEDERER, E.; LEDERER, M. 1960. Cromatografía: Revisión de sus principios y aplicaciones. Edit. El Ateneo, Buenos Aires. 752p.
- LEHNINGER, A.L. 1985. Bioquímica 10ª Ed. Barcelona. España.
- LEVERTON, R.M.; ODELL, G.U. 1985. The nutritive value of cooked meat: Oklahoma Agric. Exp. Stab.
- LEVINE, D.; HILLYER, G.; FLORES, S. 1980. Comparison of counter-electrophoresis, the enzyme-linked immunosorbent assay, and Kato fecal examination for the diagnosis of fasciolosis in infected mice and rabbits. An. J. Trop. Med. Hyg. 29: 602-608.
- LONSDALE-ECCLES, J.D.; MPIMBAZA, G.W.N. 1986. Thiol-dependent proteases of African trypanosomes. Eur. J. Biochem. 155: 469-473.
- MERCADO, R. 1989. Detección de péptidos inmunoreactivos de *Fasciola hepatica*, con suero de personas infectadas, mediante enzimo-inmuno-electrotransferencia. Bol. Chil. Parasitol. 44: 86-88.
- MORALES, M.A.; LUENGO, J.; VASQUEZ, J. 2000. Distribución y tendencia de la fasciolosis en ganado de abasto en Chile, 1989-1995. Parasitol. al Día. 24(3-4).
- MORILLA, A.; BAUTISTA, C. 1986. Manual de inmunología. Edit. Diana, México. 397p.
- MUÑOZ, C.; NIETO, A.; GAYA, A.; MARTINEZ, J.; VIVES, J. 1986. New experimental criteria for optimization of solid phase antigen concentration and stability in ELISA. J. Immunol. Methods 94: 137-144.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA (O.I.E.A.). 1989. ELISA kit for animal disease diagnosis. Joint FAO/IAEA Division Agriculture Laboratory Animal Production and Health Unit Seibersdorf, Austria.

- OUCHTERLONY, O. 1978. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allerg. 5: 1-58.
- OWEN, J. 1977. Liver fluke infection in horses and ponies. Equine Vet. J. 9: 29-31.
- PENNACCHIOTTI, M.I. 1998. Las proteínas: generalidades y su importancia en nutrición y en la industria de alimentos. Edición digital. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/pennacchiotti01/portada.html
- PFISTER, K. 1990. Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 9: 511-518.
- PIACENZA, L.; ACOSTA, D.; BASMADJIAN, I.; DALTON, J.P.; CARMONA, C. 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. Infect. Immun. 67: 1954-61.
- REDDINGTON, J.; LEID, R.; WESCOTT, R. 1984. A review of the antigens of *F. hepatica*. Vet. Parasitol. 14: 209-229.
- REMINGTON, R.D.; SCHORK, M.A. 1970. Chi-square Test for frequency data. In: Statistics with applications to the biological and health sciences. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall. 240-244.
- ROSENTHAL, P.J.; Mc KERROW, J.H.; RASNICK, D.; LEECH, J.H. 1989. *Plasmodium falciparum*: inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a

trophozoite proteinase and block parasite development. Mol. Biochem. Parasitol. 35: 177-218.

-RUIZ, A.; MOLINA, J.M.; GONZALEZ, J. 2003. Humoral response of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinase of adult fluke. Vet. Res. 34: 435-443.

-RUIZ-NAVARRETE, M.A.; ARRIAGA, C.; BAUTISTA, C.R.; MORILLA, A. 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.; HILLYER, G. 1986. Isolation of potential serodiagnostic *Fasciola hepatica* antigens by electroelution from polyacrylamide gels. Am. Trop. Med. HyG. 35: 1210-1217.

-SANTIAGO, N.; HILLYER, G. 1988. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *F. hepatica*. J. Parasitol. 74: 810-818.

-SILVA, M.; URARTE, E.; MERCADO, R.; GORMAN, T. 1993. Aplicación de inmunoelectrotransferencia empleando antígenos de excreción-secreción en el diagnóstico de fasciolosis humana. Parasitol. al Día 17: 144-146.

-SILVA, M.; VARGAS, D.; CAMPANO, S.; VEGA, F. 1995. Implementación de un ensayo de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis bovina. Parasitol. al Día 19: 150-153.

-SILVA, M.; GORMAN, T.; ALCAINO, H. 2005. Inmunodiagnóstico de fasciolosis humana y ovina empleando una fracción de 24-29 kDa de *Fasciola hepatica* obtenida mediante inmunoadsorción. Parasitol. Latinoam. 60: 38-42.

- SMITH, A.M; DOWD, A.J.; HEFFERNAN, M.; ROBERTSON, C.D.; DALTON, J.P. 1993a *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsine L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. Int. J. Parasitol 23: 977-983.
- SMITH, A.M; DOWD, A.J.; Mc GONIGLE, M.; KEEGAN, P.S.; BRENNAN, G.; TRUDGETT, A.; DALTON, J.P. 1993b Purification of a cathepsine L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. Mol. Biochem. Parasitol. 62: 1-8.
- SOULSBY E.J.L. 1988. Parasitología y Enfermedades Parasitarias 7ª Ed. Interamericana, México. pp. 36-37
- VAN TIGGELE, L.J.; OVER, H.J. 1976. Serological diagnosis of fascioliasis. Vet. Parasitol. 1: 239-248.
- VARGAS, D.; SABBE, G.; CASTRO, R.; PEREZ, C.; APT, W.; DE RICKE, P.H. 1995. Implementation of an ELISA-Test for the diagnosis in human hydatidic disease. Res. Rev. Parasitol. 55: 223-226.
- VARGAS, D.; DEL PINO, S.; GONZALEZ, C.G.; VIDAL, M. 2001. Implementación de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis equina. Bol. Chil. Parasitol. 57.
- VASQUEZ, J. 1998. Evolución de enfermedades zoonóticas a nivel humano y animal (1989 a 1995). Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 112pp.
- WENZEL, J. 1990. Inmunodiagnóstico de la fascioliasis ovina (doble difusión, contraelectroforesis y hemoaglutinación indirecta). Mem. Med. Vet. U. Chile. 103p.

-YAMASAKI, H.; AOKI, T.; OYA, H. 1989. A cysteine proteinase from the liver fluke *Fasciola spp.*: Purification, characterization, localization and application to immunodiagnosis. Jpn. J. Parasitol. 38: 373-384.

-YAMASAKI, H.; AOKI, T. 1993. Cloning and sequence analysis of the major Cysteine protease expressed in the trematode parasite *Fasciola sp.* Biochem. Mol. Biol. Int. 31: 537-542.

-ZIMMERMAN, G.L.; JEN, L.W.; CERRO, J.E.; FARNSWORTH, K.L.; WESCOTT, R.B. 1982. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 43: 2097-2100.

ANEXO 1

-Solución salina isotónica:

NaCl	0,85%
------	-------

-Solución Hedon-Fleig:

NaCl	7gr.
KCl	0,3gr.
CaCl ₂	0,1gr.
NaHCO ₃	1,5gr.
Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O	0,5gr.
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,3gr.
Glucosa	1gr.
Agua destilada c.s.p.	100ml.

-Buffer fosfato salino pH 7,2 (PBS):

KH ₂ PO ₄	0,57gr.
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	1,53gr.
NaCl	8,4gr.
Agua destilada c.s.p.	1000ml.

Reactivos empleados en ELISA

-Buffer carbonato pH 9,6 x 10:

Na ₂ CO ₃	3,97gr.
Na ₂ HPO ₄	7,32gr.
Agua destilada c.s.p.	250ml.

-Solución PBS-T20 al 0,05%:

Tween 20	50µl.
PBS	100ml.

-Solución PBS-T20 leche al 3%:

Tween 20	50µl.
Leche	3gr.
PBS	100ml.

-Buffer Citrato pH 5,0

Acido Cítrico	3,97gr.
Na ₂ HPO ₄	7,32gr.
Agua destilada c.s.p.	250ml.

-Sustrato:	2 placas	10 placas
Ortofenilendiamina (OPD)	10mg.	40mg.
Buffer Citrato	25ml.	100ml.
H ₂ O ₂	10µl.	40µl.

ANEXO 2

-Conjugados

Número Catálogo Sigma:

Ovino: Anti-Sheep IgG (whole molecule)

Peroxidase Conjugate

Nº A- 3415

Porcino: Anti-Pig IgG (whole molecule)

Peroxidase Conjugate

Nº A- 5670

Equino: Anti-Horse IgG (whole molecule)

Peroxidase Conjugate

Nº A- 6917

