

REVISION BIBLIOGRAFICA SOBRE EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE ALGUNAS HELMINTIASIS EN RUMIANTES^a

Camila Arriaga Díaz^b

Carlos Ramón Bautista Garfías^c

En el presente trabajo se compila la información reciente sobre el inmunodiagnóstico de helmintiasis de los rumiantes. Se analiza y discute la obtención y caracterización de antígenos, así como las pruebas de serodiagnóstico utilizadas para la detección de anticuerpos, antígenos o complejos inmunes circulantes, generados por los helmintos parásitos de rumiantes. Entre éstas se encuentran la doble difusión en gel de agar (DD), inmunolectroforesis (IE), contralectroforesis (CIE), hemaglutinación pasiva (HP), los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, Dot-ELISA y DIG-ELISA), así como la inmunolectrotransferencia (IET o Western blot). Se hace énfasis en las infecciones por *Fasciola hepatica* -particularmente los estudios llevados a cabo en México- y en menor grado las causadas por *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus* y *Taenia saginata*. Se concluye que para el diagnóstico de helmintiasis en rumiantes, las pruebas inmunoenzimáticas son particularmente útiles y que éstas, en muchas ocasiones, incrementan su especificidad gracias al uso de antígenos altamente específicos obtenidos por medio de métodos bioquímicos, inmunoquímicos y de biología molecular.

PALABRAS CLAVE: Helmintos parásitos de rumiantes, Pruebas de serodiagnóstico.

Téc. Pecu. Méx. Vol 35 No 2 (1997).

INTRODUCCION

Uno de los aspectos más importantes en el control de las parasitosis es contar con métodos de diagnóstico adecuados, que permitan la identificación de los animales infectados. Los métodos parasitológicos tradicionalmente utilizados permiten demostrar de manera directa la presencia del parásito; sin embargo, son laboriosos y generalmente solo se logra la detección de los parásitos cuando la infección está ya bien establecida y por lo tanto es más difícil de controlar. Es por ello que las técnicas de inmunodiagnóstico que detectan la presencia de anticuerpos contra el parásito o de antígenos circulantes en el suero de los animales infectados, se han desarrollado de manera impresionante en los últimos años ya que permiten la detección temprana de

la infección y la identificación de infecciones subclínicas, pues son muy sensibles. Además, son fáciles de realizar y permiten examinar muchas muestras en corto tiempo, lo que las hace particularmente adecuadas para estudios epidemiológicos.

Para el establecimiento de pruebas de diagnóstico serológico es necesario analizar la respuesta inmune hacia el parásito. En el caso de los helmintos, la caracterización de esta respuesta se ha visto limitada por la complejidad de los antígenos y las numerosas reacciones cruzadas que ocurren entre parásitos de este grupo. Por lo tanto, un estudio de los antígenos es un prerrequisito para entender la respuesta inmune causada por las infecciones con estos parásitos.

^a Recibido para su publicación el 23 de abril de 1997.

^b CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGAR. Km 15.5, Carretera México-Toluca, Palo Alto, 05110, México, D.F.

^c CENID-Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGAR. Km 11.5, Carretera Cuernavaca-Cuautla, Apdo. postal 206 CIVAC 62500, estado de Morelos.

Antígenos de helmintos

Los antígenos de los helmintos que se utilizan en las pruebas de diagnóstico son de tres tipos: somáticos, de superficie y de excreción/secreción (E/S).

Muchos de los antígenos somáticos son proteínas o carbohidratos estructurales o enzimas necesarias para la actividad catabólica y anabólica de los helmintos. Todos estos componentes se han conservado durante la evolución y son antígenos compartidos por muchos parásitos, por lo que pueden causar reacciones cruzadas en pruebas de diagnóstico. Estos antígenos sólo se exponen al sistema inmune del huésped cuando se destruye la envoltura del parásito y son los causantes en muchos casos de reacciones inmunopatológicas (1).

En contraste, los antígenos de superficie y de E/S son los que están más en contacto con el sistema inmune del huésped y por lo tanto causan una respuesta inmune muy fuerte. Muchos de estos componentes son especie y estadio específicos por lo que pueden ser muy útiles en pruebas de diagnóstico y también para conferir protección contra infecciones posteriores.

En las pruebas serológicas que se han desarrollado para el diagnóstico de helmintos se han utilizado los distintos tipos de antígenos descritos arriba, aunque los extractos crudos han sido usados con mayor frecuencia por su facilidad de preparación. Estos extractos contienen tanto componentes somáticos como de superficie y pueden ser útiles, sobretodo cuando se desea detectar todos los animales infectados con el parásito y no se requiere mucha especificidad. Sin embargo, los antígenos de E/S, obtenidos al incubar *in vitro* los parásitos en un medio adecuado y los antígenos de superficie purificados por cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales, son los más recomendables ya que proporcionan alta especificidad y sensibilidad en las pruebas (1).

A continuación se describen los hallazgos de estudios llevados a cabo para caracterizar los componentes antigénicos de algunos de los trematodos, nematodos y cestodos más comunes en los rumiantes y

la utilización de estos antígenos en pruebas de diagnóstico serológico.

Caracterización de antígenos

Los nuevos métodos bioquímicos e inmunológicos han permitido caracterizar los antígenos de los parásitos y se ha podido determinar el número y el tamaño de los componentes de las distintas preparaciones antigénicas; así como establecer cuáles de éstos son importantes en la respuesta inmune hacia el parásito.

Con el objeto de identificar los antígenos más relevantes en diagnóstico, se han fraccionado los componentes de antígenos somáticos y de E/S de distintos estadios de *Fasciola hepatica*, los que se han hecho reaccionar con sueros de animales infectados con el parásito. En algunos casos, se han utilizado técnicas de inmunoprecipitación, marcando los antígenos radioactivamente (2); en los últimos años, la reactividad de los anticuerpos presentes en los sueros de los hospederos hacia antígenos específicos, se ha analizado por inmunoelectrotransferencia (IET). En este caso, los antígenos se separarán electroforéticamente, de acuerdo a su tamaño, en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren a papel de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa que contienen los componentes antigénicos se incuban con sueros de animales infectados con el parásito; las inmunoglobulinas presentes en los sueros reaccionan con los antígenos del parásito y los sitios donde ocurrieron las reacciones antígeno-anticuerpo, son identificados al agregar un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, la cual da un producto coloreado al añadir el sustrato.

Utilizando esta metodología, Santiago y Hillyer (3) mostraron que componentes somáticos con peso molecular (PM) de 30 a 38 kilodaltones (kDa), son reconocidos por sueros tanto de bovinos como de ovinos infectados experimentalmente con el parásito; mientras que, un grupo de proteínas

con PM de 20 - 28 kDa fueron reconocidos preferencialmente por los sueros de ovinos y componentes de 56, 64 y 69 kDa reaccionaron únicamente con los sueros de bovinos. Estas diferencias en patrones de reconocimiento antigénico, podrían estar relacionadas por lo menos en parte, con las diferencias en resistencia a una segunda infección que presentan las dos especies. Por otra parte, los mismos investigadores, al igual que Ruiz-Navarrete y col. (4), encontraron una marcada reactividad de los anticuerpos presentes en sueros de ovinos infectados experimentalmente con el parásito hacia componentes de E/S con PM entre 23 y 27 kDa. En un estudio similar, García *et al.*, (5) corroboraron dicha observación. Esta reactividad es más notoria a partir de la sexta semana pos-infección (p.i.) por lo que, se ha sugerido que probablemente los componentes reconocidos sean los antígenos T2, que empiezan a ser secretados a través del tegumento de las fasciolas adultas en este momento, como se ha demostrado utilizando técnicas de inmunofluorescencia (6). Por otra parte, Ruiz-Navarrete y col. (4), observaron reconocimiento específico de un componente de 55 kDa por los sueros de los ovinos, desde la segunda semana después de la infección, lo cual podría ser particularmente útil en la detección temprana de la fasciolosis. Al respecto, García *et al.*, (5) utilizando anti-IgM de ovino como Ac secundario, detectaron un componente de 57 kDa a partir de la segunda semana p.i. en sueros de borregos infectados experimentalmente con *F. hepatica*. Una metodología semejante a la descrita para *Fasciola*, se ha seguido en la caracterización de antígenos de otros helmintos; así, Cuquerella y col. (7) analizaron por IET el reconocimiento de componentes de extractos solubles de la larva L-3 y del parásito adulto de *Haemonchus contortus*, con sueros de ovinos obtenidos durante una infección

experimental primaria, o una reinfección con el parásito. Los sueros de ovinos infectados con 2500 larvas L3, mostraron reactividad hacia un componente de 26 kDa de un extracto de L3, durante el período prepatente (ocho días p.i.), que se mantuvo hasta el 32 día p.i. (patencia). Se observó variación en el reconocimiento mostrado por sueros de diferentes animales, y no se pudo identificar ningún antígeno de L3 que fuera reconocido por todos los animales infectados. En contraste, dos péptidos de 25 y 26 kDa del parásito adulto, fueron reconocidos por todos los ovinos infectados durante el período prepatente y esta reactividad se mantuvo después de la reinfección; por lo que se considera que, estos antígenos podrían ser útiles en el diagnóstico de hemoncosis. En el mismo estudio se observó que se obtuvieron distintos patrones de reconocimiento de los antígenos de L3 y del adulto, lo que seguramente está relacionado con la expresión secuencial de antígenos durante el ciclo de vida del parásito.

Los antígenos de E/S también fueron analizados por inmunoelectrotransferencia, observándose que, ovinos con una infección primaria de *H. contortus*, reconocieron de manera específica un componente de 24 kDa. Cuando los animales fueron reinfectados, también se reconoció un componente de 15 kDa. Igualmente, se observó reactividad de los sueros de los animales infectados hacia otros componentes con PM entre 40 y 93 kDa; sin embargo, los mismos componentes fueron también reconocidos por sueros de animales infectados con otros parásitos como *Ostertagia circumcincta* y *Trichostrongylus colubriformis*. Basados en estos resultados, se ha considerado que los componentes de 15 y 24 kDa podrían ser útiles en el diagnóstico de *H. contortus* (8).

Pruebas serológicas de diagnóstico

Detección de anticuerpos.

Distintas pruebas han sido utilizadas para

el diagnóstico serológico de las helmintiasis en animales infectados en forma natural o experimental; entre éstas, se encuentran la doble difusión en gel de agar (DD), inmunolectroforesis (IE), contra-inmunolectroforesis (CIE), inmuno-fluorescencia (IF), hemaglutinación pasiva (HP), inmunoensayo en capa delgada (ICD) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Algunas de estas pruebas, seleccionadas por su facilidad de aplicación en el campo o en laboratorios que no cuentan con mucha infraestructura, fueron evaluadas por Arriaga y col. (9), para lo que se utilizaron sueros de bovinos infectados naturalmente con *F. hepatica*, localizados en el municipio de Tulancingo, Hidalgo, zona enzoótica de fasciolosis. Como testigos negativos se emplearon sueros de bovinos provenientes de Mérida, Yucatán, zona libre de fasciolosis, y que fueron negativos en las pruebas parasitológicas. Los sueros se examinaron mediante las pruebas de DD, HP, CIE, e ICD; además, a todos los animales se les practicó la intradermorreacción (IDR). Los antígenos utilizados en estas pruebas fueron un extracto salino crudo, un extracto salino deslipidizado y un antígeno metabólico o de E/S del parásito adulto. La prueba de ICD mostró los mejores resultados, ya que tanto la sensibilidad como la especificidad fueron bastante altos (97 y 100% respectivamente), especialmente con el antígeno metabólico o de E/S.

Estas mismas pruebas se han evaluado en ganado ovino, infectado natural y experimentalmente con el parásito. En este caso, se infectaron 13 borregos de la raza Tabasco con 150 metacercarias por animal, siguiendo por 15 semanas los cambios en los niveles de anticuerpos, utilizando extractos salinos crudos y antígenos metabólicos o de E/S. La prueba de ICD permitió observar la aparición de anticuerpos contra *Fasciola* desde la segunda semana p.i., en contraste con CIE, DD y HP se detectaron animales positivos sólo a partir

de la quinta o séptima semana p.i. (10). En cuanto a la evaluación de la prueba con sueros de ovinos procedentes de zonas endémicas o zonas libres de fasciolosis, nuevamente ICD mostró sensibilidad y especificidad elevadas, particularmente utilizando antígenos metabólicos (11).

Aunque algunas de estas pruebas han mostrado su utilidad en el diagnóstico de la fasciolosis, los ensayos inmunoenzimáticos como el ELISA, son los que actualmente se utilizan con mayor frecuencia, debido a su alta sensibilidad y la posibilidad de analizar un número elevado de sueros en corto tiempo, lo que los hace muy adecuados para estudios epidemiológicos. Diversos autores han evaluado la utilización de pruebas de ELISA para detección de anticuerpos contra *F. hepatica* en sueros y muestras de leche, de bovinos infectados natural y experimentalmente (12, 13, 14), observando buena correlación entre los resultados serológicos y parasitológicos. Sin embargo, uno de los problemas que se pueden presentar al utilizar estas técnicas tan sensibles, es que ocurran reacciones inespecíficas cuando se usan extractos crudos del parásito; por lo tanto, para la realización del ELISA es recomendable utilizar antígenos de E/S que tienen menor número de componentes (4), o antígenos purificados (15, 16).

Por otro lado, una limitante de las pruebas de ELISA es que requiere equipo especializado, el cual no siempre se encuentra en los laboratorios de diagnóstico del campo; por este motivo, se han desarrollado técnicas como el Dot-ELISA o ELISA en mancha, en las que las lecturas se realizan directamente en forma visual (17). En este caso, el antígeno se pega a papel de nitrocelulosa, que se incuba posteriormente con las diluciones de los sueros que se van a probar. Para determinar si ocurrió alguna reacción antígeno-anticuerpo, se añade un segundo anticuerpo acoplado a una enzima, la cual produce en

el papel de nitrocelulosa una sustancia coloreada que aparece como una mancha oscura al añadir el sustrato. Arriaga y col. (17) compararon esta técnica con las de HP y de ICD, utilizando sueros de ovinos infectados natural o experimentalmente. Los títulos obtenidos en Dot-ELISA con los sueros de animales infectados fueron 1000 a 2000 veces más elevados que los obtenidos en HP o ICD; además, utilizando diluciones de los sueros mayores de 1:1000, fue posible distinguir los animales infectados de los no infectados. Esta prueba podría ser de mucha utilidad en estudios de campo, ya que es posible mantener las tiras con el antígeno secas y a temperatura ambiente, por lo que serían fáciles de llevar al lugar donde se encuentran los animales, y allí mismo se podrían incubar con las muestras de sangre o de suero que se van a analizar. Otra modalidad del ELISA de fácil aplicación en el campo, es Difusión-en gel-ELISA (DIG-ELISA), la cual combina la difusión en gel de los anticuerpos con el ensayo inmunoenzimático y también se lee directamente; esta prueba ha sido evaluada con sueros de ovinos (18) y bovinos (19) infectados con *F. hepatica*, mostrando buena sensibilidad y especificidad.

En el diagnóstico de hemoncosis (*Haemonchus contortus*), se ha evaluado la utilización de distintos tipos de preparaciones antigénicas en pruebas de ELISA; al respecto, Schallig y col. (20) compararon un antígeno somático crudo y componentes de E/S de la fase adulta del parásito, con sueros de ovinos infectados experimentalmente con *H. contortus*. Se observó que a partir de la cuarta semana p.i., todos los animales fueron positivos en ELISA mientras que, en exámenes coproparasitoscópicos lo fueron a la quinta semana. Para determinar la sensibilidad y especificidad utilizaron 132 sueros de ovinos infectados experimentalmente, con distinto número de larvas de *H. contortus* y 92 sueros de ovinos libres del parásito. Se

obtuvo una sensibilidad de 89.2% utilizando el antígeno somático crudo y 97.7% con el antígeno de E/S. Considerando animales infectados únicamente con *H. contortus*, la especificidad fue de 100% con E/S y 97.8% con el antígeno somático crudo; sin embargo, cuando se incluyeron sueros de ovinos infectados con otros parásitos como *Trichostrongylus columbriformis*, *Ostertagia circumcincta*, *F. hepatica* o *Taenia ovis*, la especificidad disminuyó a 87.2 con E/S y 82.7% con el antígeno somático crudo, lo que demuestra que en ambas preparaciones hay determinantes antigénicos compartidos con estos parásitos, siendo necesario por lo tanto, utilizar un antígeno especie-específico. Los antígenos de 25 kDa del extracto somático descrito por Cuquerella y col. (7) y el de 21 kDa de los productos de E/S, identificados por Schallig y col. (8) en pruebas de IET, podrían ser los más apropiados. Este último componente está siendo clonado para ser estudiado en más detalle, y evaluado en pruebas de diagnóstico. En otros estudios, López *et al.*, (21) por medio de HP y un extracto crudo de L3, observaron un aumento de los títulos de anticuerpos anti-*H. contortus* a partir de la tercera semana p.i., en sueros de ovinos infectados experimentalmente.

Utilización de antígenos purificados en pruebas de serodiagnóstico

En las pruebas de diagnóstico de fasciolosis se han utilizado tanto extractos crudos del parásito como componentes de E/S, los cuales, como se mencionó anteriormente, proporcionan mayor especificidad que los antígenos somáticos. Hillyer y Soler de Galanes (13) evaluaron la utilización de los componentes de E/S para la detección de anticuerpos contra *F. hepatica*, en varios modelos de animales. Aunque estos antígenos permitieron detectar las infecciones desde las primeras semanas p.i. se ha encontrado que algunos de los componentes de estas preparaciones

antigénicas, también son reconocidos por sueros de ratones infectados con el trematodo *Schistosoma mansoni*, por lo que se ha planteado la necesidad de purificar componentes que sean específicos de *Fasciola*.

Entre estos antígenos específicos de género y especie se encuentran algunos componentes del tegumento, identificados en inmunoelectroforesis como «arco 2», los cuales se han purificado por precipitación con sulfato de amonio. Este antígeno fraccionado se usó en ensayos de ELISA, con sueros de conejos infectados con *F. hepatica*, pudiendo detectar la infección desde la segunda semana p.i. (22). Otras técnicas que se han utilizado para fraccionar los antígenos de E/S del parásito, son la filtración en gel y la cromatografía de alta presión (HPLC) (15), así como la cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales, dirigidos contra antígenos (T1) del tegumento (23). Los componentes así purificados ofrecen mejores perspectivas para el diagnóstico de la fasciolosis ya que proporcionan mayor especificidad.

La importancia de utilizar antígenos purificados, se ha demostrado también en otro nematodo común en los bovinos, *Dictyocaulus viviparus*. Las pruebas de ELISA utilizando extractos crudos del parásito adulto son sensibles, pero presentan reacciones cruzadas con otros parásitos como *F. hepatica* y *Ascaris suum* (24); estas reacciones fueron eliminadas al utilizar un antígeno purificado de bajo peso molecular, el cual se obtuvo del extracto crudo del parásito adulto. Además, el antígeno purificado mostró mayor sensibilidad al ser evaluado con sueros de animales infectados naturalmente con el parásito. También se obtuvo alta especificidad en un ensayo competitivo, utilizando un anticuerpo monoclonal, desarrollado contra el antígeno purificado aunque la sensibilidad fue menor que en el ELISA indirecto (24).

En el diagnóstico de la cisticercosis bovina,

también se han obtenido mejores resultados utilizando antígenos más definidos del parásito. Por IET se identificó un componente de *Taenia hydatigena* de menos de 12 kDa el cual fue reconocido específicamente por bovinos infectados con el metacestodo de *Taenia saginata*. El mismo componente mostró reactividad con sueros de humanos y de cerdos infectados con *T. saginata* o el metacestodo de *T. solium*, respectivamente; ya que hay una estrecha relación antigénica entre las distintas especies. Esta circunstancia pudo aprovecharse para desarrollar un ensayo inmunoenzimático específico para el diagnóstico de cisticercosis en humanos, bovinos y cerdos. En este ensayo el componente menor de 12 kDa fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente transferido a membranas hidrofóbicas. Se cortó el pedazo de la membrana que contenía este antígeno, en tiras de dos a tres mm de ancho; estas tiras reactivas se probaron con sueros de 10 bovinos y cuatro cerdos, inoculados con metacestodos de *T. saginata* y *T. solium*, respectivamente. Se detectaron anticuerpos contra el antígeno menor de 12kDa en estos sueros, pero no en sueros de animales infectados con *F. hepatica*, *Trichinella spiralis*, *Brucella abortus* o *Toxoplasma gondii*, ni en sueros de los animales testigos no infectados. Las tiras reactivas conteniendo el antígeno de bajo peso molecular se utilizaron también para el diagnóstico de bovinos con infecciones ligeras del metacestodo de *T. saginata* y en bovinos tratados con antihelmínticos para determinar si se detectaba la presencia de anticuerpos (25). Los anticuerpos se pudieron detectar a partir de la tercera semana p.i., incluso en animales con cargas parasitarias bajas. Los niveles de anticuerpos declinaron rápidamente después de los tratamientos con Praziquantel y Albendazole, lo que sugiere una disminución gradual del antígeno menor

de 12kDa, después de la eliminación de los parásitos vivos (25); probablemente este antígeno es un producto de secreción que no puede ser liberado después de que el parásito muere, lo que permitiría distinguir animales con una infección activa, de animales ya curados.

Obtención de antígenos específicos por técnicas de ADN recombinante.

Una de las limitantes para la utilización de antígenos purificados de los helmintos en las pruebas serológicas de diagnóstico, es contar con las cantidades adecuadas de éstos para poderlos utilizar de manera rutinaria. Las técnicas de ADN recombinante, ofrecen la posibilidad de producir cantidades suficientes de antígenos específicos, que puedan ser utilizados en el diagnóstico de las helmintiasis. Recientemente, se han identificado los genes que codifican los antígenos de *F. hepatica*, mismos que constituyen el complejo antigénico conocido como «arco 2». Muro y col. (26) utilizaron anticuerpos que reconocen los antígenos de bajo peso molecular (10 - 21 kDa) del «arco 2» para seleccionar clones de una genoteca de ADN complementario (cDNA); estas clones podrán ser utilizadas para producir antígenos recombinantes específicos para las pruebas de diagnóstico.

Zarlenga y col. (27) obtuvieron un antígeno recombinante de *Taenia crassiceps* el que mostró reactividad en ensayos de ELISA, con sueros de bovinos infectados con el metacestodo de *T. saginata*, y que no reaccionó con sueros de bovinos infectados con otros parásitos, por ejemplo *F. hepatica*. De tal forma que esta nueva tecnología permite en teoría producir antígenos definidos, los cuales a su vez, incrementarían la especificidad de las pruebas serológicas en el diagnóstico de las helmintiasis.

Detección de complejos inmunes y antígenos circulantes.

El establecimiento de métodos de

diagnóstico inmunoenzimático, centrados principalmente en la detección de anticuerpos en el suero de los animales infectados, ha sido fundamental para el diagnóstico temprano de las infecciones causadas por helmintos; sin embargo, la presencia de anticuerpos no es indicación de que se trata de una infección activa, por lo que, en los últimos años se han tratado de desarrollar métodos para detectar en el suero o en otros fluidos, antígenos de los parásitos, libres o formando complejos inmunes, lo que proporcionaría mayor evidencia de la infección.

Arriaga y col. (28) determinaron la presencia de complejos inmunes circulantes en sueros de ovinos infectados con *F. hepatica*. Esto se realizó mediante la adición a los sueros de polietilenglicol 600 (PEG), el que a bajas concentraciones favorece la precipitación de las IgG agregadas, dejando en solución las IgG monoméricas; posteriormente, se determinó el consumo de complemento en los precipitados obtenidos con PEG. Esta técnica se utilizó en 38 sueros de ovinos positivos a *F. hepatica* al examen coproparasitológico, provenientes de Tulancingo, Hidalgo, y en 15 sueros de ovinos testigos, libres del parásito, proveniente de Mérida, Yucatán. Los resultados mostraron que, la cantidad de proteína precipitada en los sueros de ovinos parasitados fue mayor que en los testigos, en todas las concentraciones de PEG empleadas, siendo mayor esta diferencia con PEG al 10% (8.5 mg en los animales parasitados y 2.6 mg en los animales testigo). Se observó además un consumo promedio de complemento de 57% en los precipitados obtenidos con sueros de ovinos parasitados, y 29% en los de ovinos no parasitados, lo que confirma la presencia de complejos inmunes en los animales infectados con *Fasciola*. También, en sueros de humanos con fasciolosis se han encontrado complejos inmunes circulantes (29), se ha sugerido que es posible que la

presencia de estos complejos probablemente esté involucrada en la patogenia de la enfermedad.

Recientemente Rodríguez-Pérez y Hillyer (30) analizaron la presencia de antígenos de E/S circulantes, en sueros de un grupo de ovinos infectados con *F. hepatica* y en sueros de un segundo grupo infectado con *Schistosoma mansoni* y 10 semanas después con *F. hepatica*. Para la detección de antígeno circulante, se utilizó un ELISA de doble anticuerpo, en el cual las placas se cubrieron con inmunoglobulinas de conejo contra componentes de E/S de *Fasciola*. Estas inmunoglobulinas atrapan los antígenos de E/S, presentes en los sueros de los ovinos infectados con el parásito. Posteriormente, se añaden inmunoglobulinas de ovino antifasciola y finalmente el conjugado de IgGs anti-ovino acopladas a peroxidasa de rábano. De esta forma, se detectaron antígenos de ES circulantes en los sueros de todos los animales del grupo infectado solamente con *F. hepatica*, a partir de la segunda semana y con un máximo a las ocho semanas p.i. Estos componentes aparentemente son específicos de *F. hepatica*, pues en el otro grupo no hubo antigenemia en las primeras semanas, cuando los animales estaban infectados únicamente con *S. mansoni*, pero sí se detectó a partir de la infección con *Fasciola*; en contraste, cuando se realizó el ELISA para detección de anticuerpos, sí se observó reactividad cruzada con sueros de los ovinos infectados con *S. mansoni*.

En el caso de la cisticercosis bovina, se ha desarrollado un método de diagnóstico basado en la detección de antígenos circulantes del metacestodo de *T. saginata* utilizando dos anticuerpos monoclonales que reaccionan con componentes de 65, 87 y 100 kDa, presentes en el tegumento y en los productos de E/S del cisticercos (31). Uno de los monoclonales se utilizó como anticuerpo de captura y el otro para revelar

la presencia del antígeno circulante, en sueros de 38 bovinos y ocho cerdos infectados experimentalmente con los metacestodos de *T. saginata* y *T. solium*, respectivamente. De esta forma, fue posible demostrar la presencia de componentes de E/S, a partir de la quinta semana y hasta la semana 15 p.i., en el suero de animales con cisticercos vivos, mientras que no se detectó antígeno circulante en animales con cisticercos muertos. Estos componentes se encontraron en gran cantidad en animales que tenían más de 500 cisticercos, pero no se detectaron en ocho animales con menos de 50 cisticercos, considerándose que la sensibilidad podría aumentar disociando los complejos inmunes que seguramente se forman. Sólo se observó reactividad cruzada con otras especies de *Taenia* como *T. ovis* o *T. solium*, pero no con diversos trematodos y nematodos comunes en los bovinos, como *Ostertagia ostertagi* y *Fasciola hepatica*. El método desarrollado se considera útil para la detección de la cisticercosis bovina, aunque sería conveniente incrementar la sensibilidad para lograr detectar animales con infecciones leves, que son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico (31).

DISCUSION

Con relación a los antígenos de helmintos, la literatura consultada indica que los antígenos más apropiados para el inmunodiagnóstico de helmintiasis, lo constituyen los componentes de E/S (1); asimismo, la técnica con mejores resultados para la identificación de componentes más relevantes, ya sea de parásitos juveniles o adultos para el diagnóstico, es la IET utilizando sueros de animales infectados natural o experimentalmente, como es el caso de *F. hepatica* (3, 4, 5) y *H. contortus* (7, 8).

En lo referente a pruebas serológicas para

la detección de anticuerpos específicos, particularmente anti-*F. hepatica* y anti-*H. contortus*, los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA estándar y sus variedades, Dot-ELISA, DIG-ELISA) sobresalen de entre las técnicas convencionales, (9, 10, 11, 20) por sus características de alta sensibilidad y capacidad para examinar un gran número de sueros en un tiempo relativamente corto (12, 13, 14, 17, 18, 19, 20).

Es importante señalar que, la especificidad de un prueba de serodiagnóstico depende en gran parte de la pureza del antígeno utilizado, como lo indican los estudios realizados en infecciones con *F. hepatica* (13, 22, 15, 23), *Dictyocaulus viviparus* (24) y el metacestodo de *T. saginata* (25). Cabe recalcar que con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante, se facilitará la obtención de grandes cantidades de antígenos específicos de parásitos para el inmunodiagnóstico de helmintiasis; baste citar la producción de antígenos recombinantes de *F. hepatica* (26) y *T. crassiceps* (27).

Por otro lado, el empleo de técnicas de inmunodiagnóstico para la detección de complejos antígeno-anticuerpo (28, 29) y de antígenos circulantes (30, 31), permite determinar la presencia del parásito en el hospedador, lo cual no es posible hacer por medio de la detección de anticuerpos específicos, porque la presencia de éstos, aunque indica que ocurrió una respuesta a la infección por un helminto determinado, no significa que el parásito se encuentre presente.

En los últimos años se han desarrollado diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de las helmintiasis; particularmente, los métodos inmunoenzimáticos han demostrado ser muy útiles, por la facilidad de realización y la posibilidad de analizar numerosas

muestras en corto tiempo. Una limitante, sin embargo, ha sido la reactividad cruzada que con frecuencia ocurre entre los componentes antigénicos de los helmintos; esto ha llevado al establecimiento de métodos bioquímicos, inmunoquímicos y de biología molecular, para tratar de obtener antígenos altamente específicos, con lo que se ha logrado incrementar la especificidad en muchos casos.

Por otra parte, se han implementado métodos para detectar en el suero, antígenos circulantes de los helmintos, libres o formando complejos inmunes, lo que constituye una prueba directa de la presencia del parásito. Todas estas nuevas metodologías contribuirán sin duda a un mejor diagnóstico y control de las helmintiasis en los rumiantes.

A BIBLIOGRAPHIC REVIEW ABOUT SEROLOGIC DIAGNOSIS OF SOME RUMINANT HELMINTHIASES.

SUMMARY

Recent information on serodiagnosis of ruminant helminthiasis is compiled in the present study. Antigen preparation and characterization are analyzed and discussed along with the use of serodiagnostic assays for detection of antibodies, antigens or circulant immune complexes generated by ruminant parasitic helminths. Among these tests, double immunodiffusion (DID), immunoelectrophoresis (IE), counterimmunoelectrophoresis (CIE), passive hemagglutination (PHT), immunoenzymatic (ELISA, Dot-ELISA, DIG-ELISA), and western blot or immunoelectrotransference (IET) assays are discussed. *Fasciola hepatica* infections are emphasized -particularly studies carried out in Mexico- and in a lesser extent those caused by *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus* and the metacestode of *Taenia saginata*. It is concluded that for the diagnosis of ruminant helminthiasis, the immunoenzymatic tests are particularly useful and that their specificity can be improved by using highly specific antigens obtained by biochemical, immunochemical and molecular biological methods.

KEY WORDS: Ruminant parasitic helminths, Serodiagnostic tests.

REFERENCIAS

- Parkhouse R M E, Almond N M, Cabrera Z, Harnett W. Nematode antigens in protection, diagnosis and pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1987; 17:313.
- Sexton J L, Milner A R, Campbell M J. *Fasciola hepatica*: Immunoprecipitation analysis of biosynthetically labelled antigens using sera from infected sheep. *Parasite Immunol.* 1991; 13: 105.
- Santiago N, Hillyer G V. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 1988; 74:810.
- Ruiz Navarrete M A, Arriaga C, Bautista C R, Morilla A. *Fasciola hepatica*: Characterization of somatic and excretory- secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 1993; 35:301.
- García Casanova L, Rodríguez Camarillo S, Bautista Garfias C R. Caracterización de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de secreción/excreción de *Fasciola hepatica* en ovinos tratados con adyuvante completo de Freund. *Tec. Pecu. Mex.* 1996; 34:136.
- Hanna R E B. *Fasciola hepatica*: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Exp. Parasitol.* 1980; 50:155.
- Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, de la Fuente C, Carrera L, Alunda J M. Lamb serum recognition of infective larvae and adult *Haemonchus contortus* antigens. *Vet. Parasitol.* 1993; 49:255.
- Schallig H D F H, Leeuwen M A W, Hendriks M L. Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 1994; 108:351.
- Arriaga C, Gómez A, Bautista C R, Morilla A. Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *Fasciola hepatica* en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. *Téc. Pec. Méx.* 1983; 44: 41.
- Ruiz-Navarrete M A, Arriaga de Morilla C, Gómez A, Bautista C R, Morilla A. Dinámica de la respuesta serológica de ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. *Téc. Pecu. Méx.* 1985; 49:78.
- Arriaga C, Gómez A, Bautista C R, Morilla A. Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *Fasciola hepatica* en el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos. *Téc. Pecu. Méx.* 1988; 26:203.
- Boulard C, Bouvry M, Argente G. Comparaison de la detection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactoserum et serum et par coproscopie. *Ann. Rech. Vet.* 1985; 16:363.
- Hillyer G V, Soler de Galanes M. Initial feasibility studies of the Fast-ELISA for the immunodiagnosis of Fascioliasis. *J. Parasitol.* 1991; 77:362.
- Westcott R B, Farrell C J, Shen D T. Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45:178.
- Rivera Marrero C A, Santiago N, Hillyer G. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 1988; 74:646.
- Santiago N, Hillyer G V. Isolation of potential serodiagnostic *Fasciola hepatica* antigens by electroelution from polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 35:1210.
- Arriaga de Morilla C, Paniagua R, Ruiz-Navarrete A, Bautista C R, Morilla A. Comparison of Dot Enzyme-linked Immunosorbent assay (Dot-ELISA), Passive haemagglutination test (PHT) and Thin Layer Immunoassay (TIA) in the diagnosis of natural or experimental *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 1989; 30:197.
- Bautista-Garfias C R, López-Arellano M E, Sánchez-Albarrán A. A new method for serodiagnosis of sheep fascioliasis using helminth excretory-secretory products. *Parasitol. Res.* 1989; 76:135.
- Fernández R M, Bautista Garfias C R, Ibarra velarde F. Evaluación de la prueba de DIG-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Fasciola hepatica* en ganado bovino. *Parasitol. al Día.* 1995; 19:4.
- Schallig H D F H, Hornok S, Cornelissen J B W J. Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 1995; 57:329.
- López Arellano M E, Bautista Garfias C R, Quiróz Romero H, Herrera Rodríguez D. Hemoncrosis experimental en ovinos: Cinética de la respuesta de anticuerpos anti-*Haemonchus contortus* y anti-eritrocitos de pollo e intradermoreacción a la fitohemaglutinina. *Tec. Pecu. Méx.* 1991; 29:53.
- Hillyer G V, Serrano A D. Fractionation of *Fasciola hepatica* tegument antigens and their application to the serodiagnosis of experimental fascioliasis by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Helminthol.* 1986; 60:173.
- Trudgett A, Anderson A, Hanna R E B. Use of immunosorbent-purified antigens of *Fasciola hepatica* in enzyme immunoassays. *Res. Vet. Sci.* 1988; 44:262.
- De Leeuw W A, Cornelissen J B W J. Comparison of three enzyme immunoassays for diagnosis of *Dyctiocaulus viviparus* infection. *Vet. Parasitol.* 1993; 49:229.
- Hayunga E G, Wong M M, Sumner M P, Isenstein R S. Evaluation of a «dipstick» immunoassay to detect cysticercosis in experimentally infected cattle. *Vet. Parasitol.* 1991; 38:13.
- Muro A, Simon Martin F, Rodríguez-Medina J R. Identification of genes that encode *Fasciola*- specific ARC 2 antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51: 684.
- Zarlenga D Z, Rhoads M L, Al-Yaman F M. A *Taenia crassiceps* cDNA encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol. Bioch. Parasitol.* 1994; 67:215.
- Arriaga de Morilla C, Ruiz-Navarrete A, Fraire M, Bautista C R, Morilla A. Complejos inmunes circulantes en ovinos infestados con *Fasciola hepatica*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 1987; 29:127.
- Knobloch J. Human fascioliasis in Cajamarca/Peru. II. Humoral antibody response and antigenaemia. *Trop. Med. Parasit.* 1985; 36:91.
- Rodríguez-Pérez J, Hillyer G V. Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *F. hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1995; 56: 57.
- Brandt J R A, Geerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, Falla N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-cretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 1992; 22:471.