

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



INSTITUTO "LOPEZ-NEYRA" (C. S. I. C.)

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**ESTUDIO INMUNOPARASITOLÓGICO
DE LA BILIS DE ANIMALES IN-
FESTADOS POR FASCIOLA HEPA-
TICA.**

JOSEFA LOZANO MALDONADO

Tesis Doctoral

Mayo 1977

T 2-112

~~Part 1 1921~~

Memoria que para optar al Grado de Doctor en Ciencias, presentó la Licenciada D^a JOSEFA LOZANO MALDONADO, el día 2 de Junio de 1977.

El Tribunal:

Presidente: Prof. Dr. D. Diego Guevara Pozo

Vocales: Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gomez

Prof. Dr. D. Jose Gonzalez Castro

Prof. Dr. D. Gonzalo Piedrola Angulo

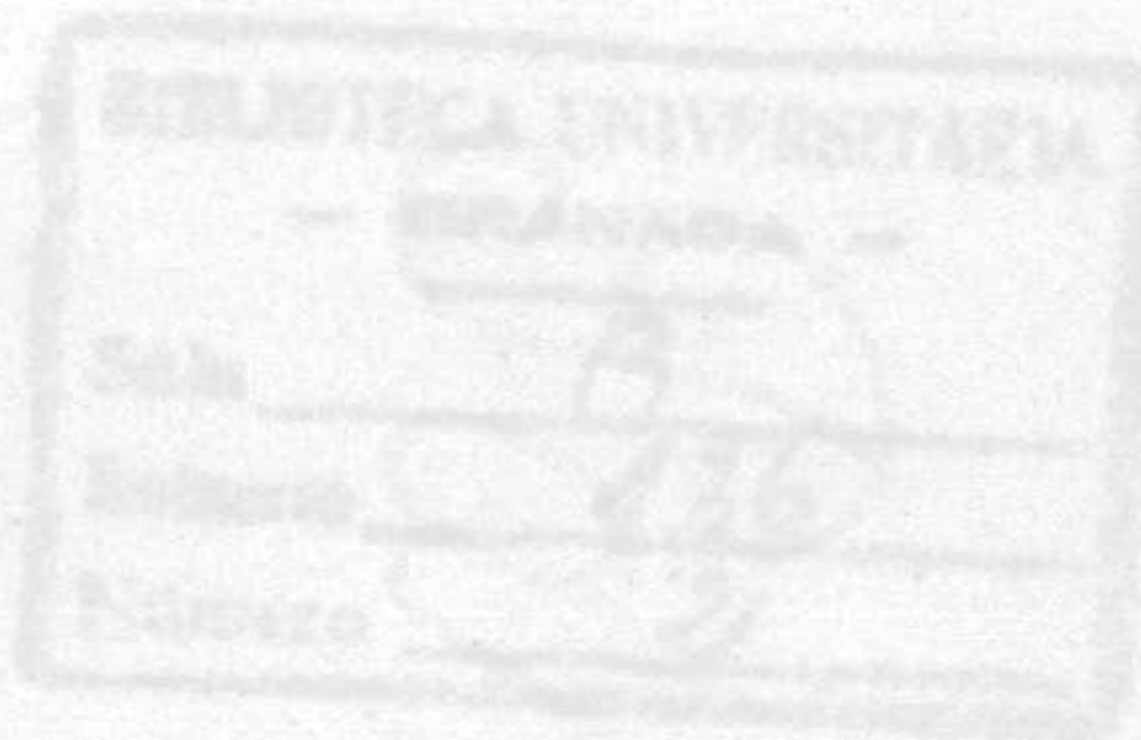
Secretario: Prof. Dr. D. Diego Carlos Guevara Benitez

Suplentes: Prof. Dr. D. Fernando Jimenez Millán

Prof. Dr. D. Fermin Sanchez de Medina Contreras

Prof. Dr. D. Eduardo Garcia Peregrin

La calificación obtenida fue de Sobresaliente "cum laude".



P. 47. 379

C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

CONS. SUP. INVEST. CIENT.
INSTITUTO "LOPEZ-NEYRA"
SECCION DE INMUNOLOGIA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
G R A N A D A
N.º Documento 613439273
N.º Copia 1539315X

"ESTUDIO INMUNOPARASITOLÓGICO DE LA
BILIS DE ANIMALES INFESTADOS POR
FASCIOLA HEPATICA."

MEMORIA QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA LA LICENCIADA Da Josefa Lozano Maldonado.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO INMUNOPARASITOLÓGICO DE LA BILIS DE ANIMALES
INFESTADOS POR FASCIOLA HEPÁTICA."

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Licenciada D^a Josefa Lozano Maldonado.

DIRECTOR:

DRA. D^a VICTORIA GOMEZ
GARCIA

CO-DIRECTOR

DRA. D^a MATILDE RODRIGUEZ
OSORIO

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria titulada "ESTUDIO INMUNOPARASITOLÓGICO DE LA BILIS DE ANIMALES INFESTADOS POR FASCIOLA HEPATICA", que para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias presenta la Licenciada D^a Josefa Lozano Maldonado, han sido realizados bajo la dirección de la Doctora:

D^a VICTORIA GOMEZ GARCIA

A handwritten signature in black ink, enclosed in a circular scribble. The signature appears to read "V. Gomez".

y co-dirección de la Doctora:

D^a MATILDE RODRIGUEZ OSORIO

Licenciada D^a Josefa Lozano Maldonado
Aspirante al Grado de Doctor

Mayo, 1977

Parte de los trabajos expuestos en esta Memoria, ha sido presentada en el PRIMER CONGRESO NACIONAL DE PARASITOLOGIA, que tuvo lugar en Granada en Septiembre de 1976.

A MI MARIDO

A MIS PADRES

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Director de esta Tesis Doctoral, Dra. Da Victoria Gomez Garcia, sin cuyo apoyo, tanto intelectual como humano, no hubiera sido posible la realización de la misma.

Al Prof. Dr. D. José Gonzalez Castro, por el interés que mostró en el desarrollo de esta Memoria Doctoral.

A la Dra. Da Matilde Rodriguez Osorio, Co-Director de esta Tesis Doctoral, por su eficaz colaboración.

Al Prof. Dr. D. Diego Guevara Pozo, Director del Instituto "Lopez-Neyra" de Parasitología, por las facilidades concedidas durante la realización de este trabajo.

A mis entrañables amigas y compañeras de trabajo, Idas. Margarita Campos Bueno e Inmaculada Mañas Almendros, por su valiosa y desinteresada ayuda a lo largo de este trabajo.

A mis compañeros de Sección, Ida. Mercedes Morales Torres, Sta. Pilar Navarro Cuesta y D. Vicente Agustín Vacas, quienes me ayudaron en todo momento.

Al Dr. D. Antonio Osuna Carrillo, por su paciencia e inestimable ayuda en la realización de las fotografías.

A Da Gracia Castro y Sta. Concepción Rodríguez,
encargadas de la Biblioteca de este Centro, por la compe-
tencia y simpatía con que siempre me atendieron.

Mi reconocimiento se extiende a todos mis amigos
y compañeros del Centro, que de alguna manera me ayudaron
en la realización de este trabajo.

I N D I C E

| | pag. |
|--|------|
| 1.- INTRODUCCION | 1 |
| 2.- INMUNOLOGIA DE LA FASCIOLOSIS | 14 |
| 2.1.- INMUNIDAD ADQUIRIDA | 14 |
| 2.2.- INMUNIDAD PASIVA | 26 |
| 2.3.- INMUNIDAD ARTIFICIAL | 30 |
| 2.4.- DIAGNOSTICO | 38 |
| 2.5.- ESTRUCTURA ANTIGENICA DE <u>FASCIOLA HEPATICA</u> | 51 |
| 3.- ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA BILIS DE ANIMA- LES PARASITADOS POR <u>FASCIOLA HEPATICA</u> ... | 56 |
| 3.1.- MATERIAL Y METODOS | 56 |
| 3.1.1.- Obtención de los parásitos | 56 |
| 3.1.2.- Preparación de los extractos antigénicos. Determinación de su contenido en proteínas. | 57 |
| 3.1.2.1.- Extracto total de <u>Fasciola hepática</u> | 57 |
| 3.1.2.2.- Extractos de hígado de choto y borrego .. | 58 |
| 3.1.3.- Obtención de muestras biliares | 62 |
| 3.1.4.- Obtención de sueros de animales espontánea- | |

| | pag. |
|--|------|
| mente infestados | 63 |
| 3.1.5.- Obtención de sueros de animales normales | 63 |
| 3.1.6.- Obtención de inmunisueros | 64 |
| 3.1.6.1.- Preparación de sueros anti-extracto total de <u>Fasciola hepática</u> | 64 |
| 3.1.6.2.- Preparación de sueros anti-bilis normal | 65 |
| 3.1.6.3.- Preparación de sueros anti-suero de borrego | 66 |
| 3.1.6.4.- Sueros anti-albúmina y anti-gamma globuli- nas ovina | 69 |
| 3.1.7.- Técnicas de electroforesis, inmunodifusión e inmunolectroforesis | 69 |
| 3.1.7.1.- Electroforesis | 69 |
| 3.1.7.2.- Inmunodifusión | 72 |
| 3.1.7.3.- Inmunolectroforesis | 74 |
| 3.1.8.- Precipitación de gamma globulinas con sul- fato amónico | 78 |
| 4.- RESULTADOS | 80 |

pag.

| | |
|---|-----|
| 4.1.- ANALISIS ELECTROFORETICO E INMUNOELECTROFO- | |
| RETICO DE LA BILIS VESICULAR OVINA | 80 |
| 4.2.- INVESTIGACION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS | |
| EN BILIS DE ANIMALES PARASITADOS POR <u>FASCIO-</u> | |
| <u>LA HEPATICA</u> | 94 |
| 5.- DISCUSION | 116 |
| 6.- CONCLUSIONES | 138 |
| 7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 141 |

1.- I N T R O D U C C I O N

Fasciola hepática, es un parásito común de los conductos biliares del ganado vacuno, ovino y caprino. También se ha encontrado en muchos otros animales incluyendo marsupiales, roedores, cerdos, caballos, carnívoros, conejos y monos.

Siguiendo a Craig y Faust, 1974 (1), Fasciola hepática pertenece al Phylum Platyhelminthes, Clase Trematoda, Subclase Digenea, Familia Fasciolidae.

Para alcanzar un estado de completo desarrollo, pasa por estadios larvarios muy complicados hasta alcanzar el hígado, víscera que le sirve de albergue en el hospedador definitivo. Los huevos, son depositados, sin madurar, en los conductos biliares del hospedador y se evacúan con las heces. Maduran en el agua, se abren, los miracidios quedan en libertad e invaden caracoles, incluyendo muchas especies de Lymnaea y otros géneros de la Familia Lymnaeidae, transformándose en la siguiente fase larvaria, el esporocisto. Si las condiciones ambientales son adecuadas, aproximadamente después de tres semanas, los es-

porocistos producen la primera generación de redias, al cabo de una semana más, se produce la segunda generación de redias y las cercarias, éstas salen del caracol al agua, pierden la cola y se enquistan en la vegetación acuática, en cortezas o en el agua.

Los mamíferos, contraen la infestación al comer esas plantas o al beber en los lugares contaminados con las metacercarias enquistadas. Estas se desenquistan en el duodeno, perforan la pared intestinal, migran a la cavidad peritoneal, atraviesan la cápsula de Glisson, penetran en el parénquima hepático y llegan a los conductos biliares, en los que se fijan y crecen hasta llegar a la madurez.

El período de prepatencia, en el huésped definitivo, dura tres o cuatro meses aproximadamente, tiempo en el que el parásito se hace adulto y está en condiciones de formar sus huevos que salen con la bilis, ganan el duodeno y se expulsan con las heces para reiniciar un ciclo semejante.

Respecto a su extensión, podemos decir que exis-

te en todas las latitudes, desde Siberia hasta Africa Austral y Argentina. El reflejo más inmediato de esta parasitosis, se traduce en las grandes pérdidas económicas que ocasiona, pues no es una enfermedad aguda, cuya presentación epizootica brusca, afectando a gran número de reses y produciendo la muerte de muchas de ellas, determine la alarma del ganadero, del veterinario e incluso de los poderes públicos. Por el contrario, es un padecimiento que, salvo en casos muy poco frecuentes y limitados a animales jóvenes sometidos a intensas infestaciones, discurre de forma crónica. No ostenta manifestación clínica dramática, pero se mantiene durante meses y años, produciendo lesiones progresivas, en un órgano vital como es el hígado, que si no llevan a la muerte, crean un estado deficitario de salud. Esto, repercute sobre la capacidad de trabajo del animal, en sus funciones reproductoras, en la calidad de sus lanas, en la producción de leche y finalmente, en el rendimiento de sus carnes, incluyendo en este último capítulo, no sólo el peso de la canal, por el enflaquecimiento causado, sino la pérdida de hígados que no pueden destinarse al consumo.

En España, la enfermedad se conoce desde hace mucho tiempo, Gonzalez Castro, 1948 (2), estudia la dis-

tribución geográfica en el ganado y llega a las siguientes conclusiones:

- 1º) En una tercera parte de las provincias españolas, el ganado está afectado de fasciolosis. El porcentaje de parasitación varía muy ampliamente de unas provincias a otras, llegando en algunas de ellas, como la de Orense, casi a un 100 % en ovinos y bovinos y a un 90 % en caprinos.
- 2º) El ganado lanar es el más atacado, siguiéndole el bovino y cabrío.
- 3º) Es más frecuente el parasitismo en zonas bajas y con pastos encharcados.
- 4º) A excepción de Barcelona, donde se sabe existen Lymnaea truncátula y L. peregra y Lérida y Zamora donde existe L. truncátula, se desconocen las especies de Lymnaeas, posibles intermediarios de F. hepática, en las distintas provincias españolas.

Referente a la provincia de Granada, Gonzalez Castro en 1948 (2), hace un profundo estudio de ella; esencialmente de dos zonas donde se tenía certeza de la existencia de este parasitismo. Fueron estas dos zonas, la Vega del Genil y la región costera. Efectivamente, en la

primera, encontró que el 80 % del ganado estaba infestado. La región costera, a pesar de ser menos ganadera, dió un alto índice de infestación.

En esta misma provincia, Lizcano Herrera, 1961(3), estudia la zona de la Alpujarra, concretamente la de Trevélez, llegando a la conclusión de que los pueblos más afectados son Trevélez, Bérchules, Busquístar, Capileira y Pampaneira con un 100 % de parasitación y con un 85 % los de Pórtugos, Bubión y Mecina Bombarón. Este autor, estima en 535.000 pesetas las pérdidas ocasionadas por el parasitismo en esta reducida zona.

Elorza, 1973 (4), hace un estudio en Elgoibar (Guipúzcoa) sobre la incidencia de la fasciolosis en el ganado vacuno mayor, sacrificado en el matadero en los años 1951 y 1952, encontrando un 17 y un 33 por 100 de parasitación y estima que la disminución láctea en las vacas enfermas es del 21 al 73 por 100 según los casos, además de aquellos de esterilidad y aborto precoz.

Fraga de Azevedo, 1965 (5), estima en 1.600.000 escudos la pérdida anual por este parasitismo en Portugal,

aparte de los 80.000 Kg de vísceras aproximadamente, que tienen que ser retirados del consumo.

En Gran Bretaña, este parásito causa grandes pérdidas a las industrias lecheras y de carne de vaca. Froyd, 1974 (6), ha realizado un estudio sobre la incidencia de esta helmintiasis, desde Noviembre de 1972 a Marzo de 1974, en un gran número de mataderos repartidos por toda Inglaterra, Escocia y Gales. Los resultados mostraron:

- 1) Que la incidencia de este parasitismo en todo el ganado examinado, dió un porcentaje medio de un 22 %.
- 2) La incidencia en vacas fue de un 39 %.
- 3) Hubo relativamente poca variación en la incidencia mensual a través del año.
- 4) La incidencia en corderos fue del 4 % y en ovejas adultas de un 13 %.

Pitois, 1972 (7), realiza también un estudio de la incidencia de la fasciolosis bovina, en 418 animales sacrificados en el matadero de Bethune (Francia). El porcentaje de hígados dañados osciló desde un 35 % en los novillos, a más de un 60 % en el ganado vacuno de 5 años

aproximadamente. El 50 % del ganado del Norte de Francia y un 75 % de distintos distritos, estaban infestados.

Ueno y Alvarez, 1974 (8), examinando 1.100 muestras de heces de ganado vacuno procedentes de 52 granjas de 12 provincias de la República Dominicana, encontraron que el 78 % eran positivas a F. hepática.

En el hombre, la enfermedad no es tan frecuente como en los animales, aunque los casos denunciados de fasciolosis humana en la actualidad, se elevan a varios millares.

Craig y Faust, 1974 (1), señalan que la infestación humana se ha observado en Venezuela, Uruguay, Argentina, Chile, Puerto Rico, Cuba, Costa Rica, Siria, Turquía, China, Unión Soviética (incluyendo Turquestán y Tashkent), Polonia, Madera, Inglaterra, Francia Italia, Córcega, España, Hungría, Rumania, Salónica, Dardanelos, Argelia, Somalia francesa, Africa del Sur y Hawai. Únicamente fue denunciada una infestación, en el hombre, en los Estados Unidos (Norton y Monroe, 1961 (9)). La fasciolosis es una enfermedad que ha adquirido una gran impor-

tancia en el hombre en los países de Iberoamérica, así como en Francia, Argelia y otros países del Mediterráneo. Bürgi, 1936 (10), denuncia 186 casos en Alemania. Kouri, 1948 (11), 100 casos en Cuba. Rodríguez, 1952 (12), 20 casos en Argentina.

Carvão Gomes y Silva Xavier, 1956 (13), comunican que la infestación humana sólo había sido descrita en Portugal en 13 casos hasta el comienzo de su trabajo. Ellos, denuncian un caso más.

Sampaio Silva y col. 1974 (14), comienzan en Febrero de 1973 un estudio epidemiológico en Amares (Portugal), demostrando que de 664 personas, 68 (10,2 %) tenían huevos en heces. En 100 casos, se realizaron pruebas serológicas, por inmunolectroforesis e inmunofluorescencia, al mismo tiempo que exámenes coprológicos y se revelaron otros 15 casos positivos.

Los análisis serológicos, muestran una más alta incidencia de la enfermedad, ya que con ellos se descubre el parasitismo en su fase crónica e inicial, donde los huevos no aparecen normalmente en heces.

Facey y Marsden, 1960 (15), denuncian una epidemia en Hampshire que afectó a seis personas. Es la primera de que se tiene noticia en Inglaterra, aunque con anterioridad habían ocurrido casos aislados.

Ontaneda y col. 1968 (16), describen un caso en una mujer de 54 años, residente en Quito.

Mohsenin y col. 1969 (17), describen un caso en Teherán. Anteriormente se habían comunicado dos casos encontrados fortuitamente durante una operación de vesícula biliar y de glándula tiroides.

Cesar Naquira y col. 1972 (18), realizan un estudio epidemiológico en dos localidades del valle del Río Mantaro (Perú) en el año 1968, encontrando que de 258 muestras de heces, el 11,2 % fue positivo a huevos de Fasciola y de 160 muestras de sangre, el 14,48 % fue positivo para F. hepática.

Kluska y col. 1973 (19), describen un caso de fasciolosis en una niña de 4 años en Polonia.

Draghici y col. 1974 (20), en Bucarest, en el período de 1966 a 1973, realizan un estudio epidemiológico en el que descubren 11 casos de fasciolosis humana. Las edades de los individuos parasitados estuvieron comprendidas entre 15 y 66 años. Nueve de ellos eran agricultores, en zonas donde es frecuente encontrar fasciolosis en los animales.

Dentro de Europa la nación más afectada es Francia, donde se registran cada año numerosas epidemias, localizadas principalmente al Sur del Loire. Deschiens, 1958 (21), hace un estudio de su distribución desde 1943 y encuentra lo siguiente: en 1943 epidemia en Ruy de Dôme; 1944 epidemia de toda una familia de la región roanesa; 1949 epidemia de una familia al beber agua contaminada.

Coudert y Triozon en 1956-1957 (22), revelan una epidemia que llegó a alcanzar a 50 personas.

En los Bajos Pirineos, concretamente en Bayona, se dieron también numerosos casos, en vista de lo cual, la Academia de Medicina, designó una comisión para el estudio de medios profilácticos.

Leseq y col. 1972 (23), describen un caso no usual de infestación por F. hepática en una niña de 12 años, residente en Paris, aparentemente sana, con manifestaciones neurológicas que se atribuyeron a un mecanismo alérgico.

Kaneda y col. 1974 (24), describen un caso de fasciolosis en Knagawa (Japón).

Respecto a la casuística humana de esta enfermedad en nuestra patria, podemos decir que el primer caso humano fue dado a conocer por Martín de la Calle, 1890 (25), en Segovia. En 1944, Dominguez, Cubero y Camacho (26), publicaron otro caso en Sevilla. Torres Lopez, Gonzalez Castro y Sanchez Jimenez, 1945 (27), dieron a conocer un tercero. Poco después, Luengo en 1946, descubre el cuarto caso. Garcia Barón, 1950 (28), en una enferma operada de colecistectomía, extrae del colédoco, 20 cálculos pequeños y 5 fasciolas. Un nuevo caso fue confirmado por Morell Cuéllar y Gonzalez Castro, 1951 (29), en una mujer en cuyas heces se habian encontrado huevos de distómidos.

Posteriormente, Gonzalez Castro (comunicación

personal) en unos 18.000 análisis coprológicos efectuados por él de 1963 a 1967 en el laboratorio del S.O.E. de Granada, encontró en 5 casos huevos de Fasciola.

Este mismo autor en 1948, estudia la posibilidad de que en una zona donde es frecuente la fasciolosis animal, se encuentren casos de fasciolosis humana; así, describe tres casos, todos granadinos, observados en corto espacio de tiempo, dos en Almuñecar y uno en Chauchina.

Recientemente, en nuestro laboratorio, hemos tenido oportunidad de diagnosticar dos casos de fasciolosis humana, por la técnica de inmunolectroforesis, uno de ellos correspondía a una enferma con un cuadro clínico sospechoso de esta parasitosis y en la cual hubo una eosinofilia del 22 %. El segundo caso nos fue remitido con sospecha de padecer una hidatidosis hepática. Realizada la inmunolectroforesis con líquido hidatídico, resultó negativa. Por el contrario, al emplear un extracto antigénico de Fasciola hepática obtuvimos un arco de precipitación.

Hernandez y col. 1967 (30), describen un caso en la provincia de Toledo.

Como puede verse la fasciolosis humana existe en España y aunque los casos denunciados hasta ahora son escasos, éstos deben ser más abundantes, pues generalmente esta enfermedad es desconocida por la mayor parte de los clínicos.

2.- I N M U N O L O G I A D E L A F A S C I O L O S I S

2.1.- INMUNIDAD ADQUIRIDA

Los trabajos realizados con objeto de determinar la existencia de una inmunidad adquirida en la fasciolosis animal, han sido numerosos y sus resultados muy variables.

Lang, 1966a (31), 1966b (32), realizó experiencias con objeto de comprobar, en el ratón, la existencia de este tipo de inmunidad. Cuando infestaba a los animales con una dosis simple de metacercarias, los vermes no migraban del hígado a los conductos biliares hasta 30-40 días después. Sin embargo, dando una dosis estimulante simple y otra posterior, algunos de los parásitos alcanzaban los conductos biliares a los 20 días y durante 40 días había una reducción significativa en el número de parásitos recogidos. Esto era debido a la inmunidad inducida por la primera infestación que impidió que los gusanos de la segunda alcanzaran los conductos biliares y como resultado de ella fueron destruidos. El hecho de encontrar parásitos muertos en la cavidad peritoneal, apoya esta hi-

pótesis.

Lang, 1967 (33), inmunizó ratones con metacercarias, mediante dos infestaciones sucesivas, realizadas con un intervalo de 60 días. Pasados 40 días a partir de la segunda infestación, administró una nueva dosis tanto a los ratones inmunizados como a un grupo control. El grado de inmunidad se evaluó por contaje, localización y tamaño de los parásitos, así como por histopatología y pruebas serológicas. Los ratones a los que fueron administradas dos dosis infestivas estimulantes, respondieron mucho más rápidamente que los controles, ya que almacenaron significativamente menos parásitos que éstos. El título de anticuerpos, determinado por hemaglutinación fue más alto. Hubo también notables diferencias en la histopatología hepática y las infiltraciones de pequeños y medianos linfocitos fueron mucho más intensas. Asimismo el tamaño de los parásitos fue menor.

Posteriormente, Lang, 1968a (34), utilizando el mismo sistema Fasciola-ratón, realizó experiencias con cuatro grupos de ratones, en el primero fueron administradas dos dosis estimulantes de metacercarias, con un intervalo

de 60 días, seguidas de otra 40 días más tarde. En el segundo grupo, la infestación estimulante fue seguida por otra 100 días más tarde. En el tercer grupo, fueron realizadas dos infestaciones separadas 40 días. El cuarto grupo sirvió de control.

A los 25 días de la infestación, fue observada una reducción significativa del número de parásitos en todos los grupos inmunizados, en comparación con el control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además de esta reducción, hubo una marcada diferencia en la localización de los parásitos. La separación de 100 días entre dos dosis infestivas, no mostró un decrecimiento significativo en el número total de parásitos recogidos.

Los factores inmunes, responsables de la inmunidad adquirida, son efectivos entre los días 20 y 25, ya que en este tiempo gran número de fasciolas fueron halladas muertas o moribundas en la cavidad peritoneal de los animales.

Transfiriendo fasciolas, procedentes de ratones

normales (infestados), 17 días después de la infestación, a ratones normales, estos vermes migraban y maduraban en los conductos biliares; sin embargo cuando fasciolas de la misma edad eran extraídas de ratones inmunes y transferidas a ratones normales, no completaban la migración a los conductos biliares. La respuesta inmune se realiza pues frente a los parásitos jóvenes, durante la fase migratoria hepática (Lang, 1968b (35)).

Lang y Dronen, 1972 (36), transfirieron fasciolas de 8 y 16 días de edad a ratones receptores normales por vía intraperitoneal. A las 72 horas de la transferencia, alcanzaron el hígado y al completar los 32 días de edad, los conductos biliares. Las fasciolas de 8 días, estuvieron presentes en el parénquima hepático de los ratones durante 21-22 días, mientras que las de 16 días permanecieron de 13-14 días.

Cuando los vermes transferidos completaron los 40 días de edad, los ratones se infestaron nuevamente. A los 25 días de esta infestación, se comprobó una reducción significativa en el número de parásitos recogidos. Parece ser por tanto, que los parásitos jóvenes son capaces



de inducir una inmunidad adquirida durante el período de migración hepática.

Posteriormente Lang, 1974 (37), realizó experiencias con objeto de dilucidar si el factor estimulante de la inmunidad adquirida era la edad del parásito o la duración de la migración hepática. Transfiriendo fasciolas de 12, 14, 16, 18, 20 y 24 días, comprobó que la inmunización con parásitos de 12, 14, 16 y 18 días, dió lugar a una reducción significativa de su número en la segunda infestación. En estos ratones, el tiempo que duró la migración fue de 10-11 días. Por el contrario, la transferencia de fasciolas de 20 y 24 días a ratones, mostró un tiempo de migración más corto y no hubo una reducción significativa en el número de parásitos.

Basándose en estos resultados, el autor sugiere que la duración de la migración hepática, de al menos 10-11 días, realizada por fasciolas jóvenes, es la responsable de la inmunidad adquirida y no la edad específica del parásito joven.

En ratones normales, la transferencia intraperi-

toneal de fasciolas jóvenes de 12, 16, 18, 20 y 24 días de edad, que previamente habían sido incubadas durante cuatro horas en suero inmune, dió como resultado una reducción significativa del número total de parásitos recogidos, comparativamente con un grupo control en el que se había hecho transferencia de fasciolas incubadas en suero normal. Con estos ensayos se demostró el papel de los anticuerpos humorales en la inmunidad adquirida (Lang, 1974 (38)).

Los trabajos comentados hasta ahora, han sido los primeros que de manera concluyente han demostrado la existencia de una inmunidad adquirida en las infestaciones con Fasciola hepática en el ratón.

En las ratas, la inmunidad adquirida ha sido ampliamente estudiada. Estas, son excelentes animales de laboratorio para el estudio de las relaciones huésped-Fasciola hepática

Hayes y col. 1972 (39), infestaron ratas con cinco metacercarias mediante intubación esofágica. A los 49 días repitieron la infestación en las mismas condicio-

nes y comprobaron, después del sacrificio a los 70 días, que comparativamente con un grupo control, al que solamente se le administró la primera dosis infestiva, la reducción del número de parásitos fue del 92,5 % y también que la edad de los animales receptores no influía en la producción de este tipo de inmunidad.

Posteriormente, fue comprobado el efecto de dos niveles diferentes de infestación primaria sobre la reinfestación con F. hepática. Administrando 1 y 10 metacercarias como dosis infestivas primarias y 10 en la dosis de reinfestación, la reducción en el número de parásitos recogidos fue altamente significativa en ambos grupos. El hecho de que la infestación con una sola metacercaria, fuera capaz de causar una marcada reducción en el número de parásitos de la reinfestación, indica que la inflamación no específica del hígado y el daño existente en el momento de la reinfestación, no juegan un papel decisivo en la inmunidad (Hayes y col. 1973 (40)).

Hayes y col. 1974 (41), demostraron que la fasciolosis crónica de la rata (7-12 meses de duración) produce un alto grado de inmunidad y que esta inmunidad es-

tá influenciada por la edad de los animales.

La inmunidad adquirida en ratas, ha sido también estudiada trasplantando 5-6 adultos en la cavidad peritoneal de animales previamente inmunizados (Armour y col. 1974 (42); Goose y Macgregor, 1974 (43)).

El intento de demostrar la inmunidad adquirida en conejos, fue realizado por Ross, 1966 (44), observando que en la segunda infestación de conejos inmunizados con una dosis oral de 75 metacercarias, existe una reducción del número de duelas que se establecen y un retraso en su desarrollo.

El nivel de inmunidad adquirida por la infestación inicial no fue alto en estos animales y los resultados indicaron que la variación individual es grande.

Por otra parte, Kendall y col. 1967 (45), también comprobaron en conejos, un cierto grado de resistencia a la reinfestación con metacercarias de F. hepática.

Una infestación primaria junto con la administración de hexaclorofeno, 12 semanas después, producen en conejos una reducción significativa en el número de duelas de una segunda infestación, en comparación con animales controles, (Kendall y Sinclair, 1971 (46)).

Sinclair y Joyner, 1974 (47), introdujeron extracto antigénico de duelas adultas, en los hígados de conejos infestados con F. hepática, por inyección dentro de las venas mesentéricas. Los cambios así inducidos, produjeron un medio ambiente en los tejidos que fue adverso al establecimiento de una segunda infestación. Esto dió como resultado, la reducción a la mitad, del número de duelas en la segunda infestación.

Thorpe, 1965 (48), mostró que la determinación de la cantidad de glutámico oxalacético transaminasa en el suero (SGOT), es el método más sensible para estimar el daño hepático. En experiencias con F. hepática, (Sinclair y Joyner, 1974 (47)) los valores de la actividad de SGOT mostraron que el daño hepático se produjo con la infestación, así como por la inyección de extracto antigénico.

Estos autores consideran que el daño hepático, es producido por una reacción de tipo anafiláctico, la cual es responsable de los cambios en los tejidos.

Fortmeyer, 1975 (49), infestó intraperitonealmente conejos con 20 a 30 metacercarias y 42 días más tarde les dió una infestación oral de 50 metacercarias, no mostrando evidencia de inmunidad en términos del número de duelas que crecieron en el hígado, que fue algo reducido comparado con los controles. Sin embargo, con un intervalo de 94 a 115 días entre la infestación intraperitoneal y la oral, se produjo una marcada inmunidad. Esta inmunidad, fue inducida por duelas adultas que viven solamente en los conductos biliares.

Ha sido aceptado generalmente, que el ganado vacuno desarrolla una resistencia particular a la fasciolosis en comparación con las ovejas (Taylor, 1949 (50)). En infestaciones simples en becerros y cuando el nivel de infestación está incrementado, el retraso e inhibición del desarrollo del parásito, tiene como consecuencia la reducción del número de adultos que se desarrollan en los conductos biliares (Ross, 1965a (51)). Cuando el nivel

es bajo y la segunda infestación es dada 18 semanas después de una infestación inicial similar, tiene lugar el fenómeno de "autocuración", observándose que los parásitos adultos, son expulsados de los conductos biliares (Ross, 1966a, 1967a, (52) (53)) esto pudiera ser debido a la cirrosis hepática producida por una infestación inicial que, combinada con un mecanismo inmune, impediría el desarrollo de la segunda infestación. Además, se produce calcificación de los conductos biliares lo que crea un medio ambiente peligroso para los parásitos adultos y por tanto, contribuye al desarrollo de la "autocuración".

Doyle, 1971 (54), observó también que en becerros con infestaciones primarias, en el caso de un nivel moderado de infestación, la población de parásitos era expulsada por el proceso llamado "autocuración" y que estos becerros con una infestación primaria, mostraban una alta resistencia a la reinfestación, ya que, en los becerros reinfestados, se recogieron solamente el 16 % del número de parásitos de los becerros controles infestados.

Este fenómeno de las infestaciones primarias, lo confirmó Over, 1974 (55), en un grupo de bueyes. Sin

embargo, la administración de una segunda y tercera infestación, no dió lugar a reducción en el número de duelas.

Armour y col. 1974 (42), observaron en el ganado vacuno que una infestación primaria junto con un antihelmíntico efectivo, dado 11 semanas después, confieren una alta resistencia frente a una segunda infestación.

Bugge, 1927 (56) y Durban, 1952 (57), observan que en las ovejas, no se produce calcificación de los conductos biliares, por lo que la vida de las duelas es más larga y la infestación continuada, dando como resultado una acumulación de duelas adultas en los conductos biliares.

Leiper, 1938 (58), utilizando cabras como hospedadores y Taylor, 1949 (50), trabajando con ovejas, no encontraron evidencia de que se desarrollara resistencia a F. hepática después de la infestación.

Boray, 1967 (59), infestando ovejas, no pudo

demostrar la existencia de una inmunidad adquirida en estos animales.

2.2.- INMUNIDAD PASIVA

Para demostrar que la hipersensibilidad (celular) retardada juega un papel importante en la inmunidad frente a F. hepática, Lang y col., 1967 (60), transfirieron intraperitonealmente células de exudado peritoneal de ratones, previamente infestados con metacercarias de F. hepática a ratones normales y observaron que estas células conferían una resistencia significativa frente a una infestación.

Utilizando células linfoides de ratas infestadas con metacercarias tratadas con Rayos-X y transfiriéndolas a receptores isogénicos, Corba y col., 1971 (61), demostraron una resistencia similar. El mismo resultado obtuvieron en un par de becerros monozigóticos. Por el contrario, la utilización de suero inmune fracasó en la protección de ratas y becerros.

En ovejas, Sinclair, 1971 (62), no logró comprobar la existencia de inmunidad frente a F. hepática, mediante la administración, inmediatamente antes de la infestación, de homogenado de nódulos linfáticos y bazo, obtenidos de ovejas infestadas.

Aunque es bien conocido que la infestación con F. hepática está asociada con la respuesta humoral moderada, hay pocos trabajos sobre la transferencia de inmunidad mediante suero de donadores infestados. Wickerhauser, 1961 (63), inyectó a varios cobayas suero bovino inmune, pero no observó efecto inhibitorio sobre una infestación oral dada 2 o 3 horas más tarde.

El suero inmune de conejo inyectado por vía intraperitoneal a ratones, no influyó en la infestación de estos, (Dawes y Hughes, 1964 (64)).

Hayes y col. 1974 (65), demostraron que el suero de ratas infestadas, transferido intraperitonealmente, dió un grado altamente significativo de protección, a ratas receptoras, infestadas al mismo tiempo de la transferencia, en comparación con el efecto del suero normal

o con ratas controles a las que no se había transferido suero.

Sin embargo, el suero transferido 14 días después de la infestación no tuvo efecto significativo. Por tanto, la resistencia está relacionada aparentemente con los parásitos menores de 14 días, siendo estos afectados, durante su migración a través de la cavidad peritoneal.

En un trabajo posterior Hayes y col. 1974 (66), observaron que el suero de ratas donadoras infestadas durante 7-8 semanas (infestación subaguda) fue efectivo, mientras que el suero ratas infestadas durante 25 semanas (infestación crónica) no lo fue.

Igualmente, fue efectiva una mezcla de inmunisero cuando se dieron 1, 2,5 o 5 ml por rata el mismo día de la infestación, pero no, cuando se dieron 2, 4, 6 u 8 días después de ésta. Este efecto protector del suero se eliminó mediante tratamiento con calor o adsorción con hígado o F. hepática desecada.

Dargie y col. 1973 (67), demostraron que célu-

las linfoides obtenidas del bazo y de nódulos linfáticos, mesentéricos y hepáticos de ratas, infestadas 10 semanas antes con metacercarias de F. hepática y transferidas a ratas receptoras confirieron un grado significativo de inmunidad (30-81 %) frente a una infestación simultánea.

Armour y Dargie, 1974 (68), observaron que el grado de protección, obtenido mediante la transferencia de células, estaba relacionado con la intensidad del estímulo antigénico en las ratas donadoras, así la transferencia de células linfoides de donadores con alto número de parásitos (7-8 duelas) da significativamente más protección a ratas receptoras que las células transferidas de ratas que albergan pocas duelas.

Estos autores, demuestran también, que las ratas pueden ser inmunizadas frente a F. hepática, usando suero de ratas o de ganado parasitados con F. hepática adulta. Cuando se emplean cantidades suficientes, la protección es del orden del 60-80 %. Parece que existe una relación entre el grado de protección y el volumen de suero transferido, así en ratas que recibieron 0, 5, 10

y 20 ml de inmunisero bovino, el número medio de duelas recogidas después de una segunda infestación con 20 metacercarias, fue de 3,6; 2,0; 1,4 y 0,6 respectivamente.

Resultados similares se obtuvieron por transferencia de suero de ovejas infestadas con duelas. El fraccionamiento del suero, indicó que la presencia de IgG era necesaria para que la protección se llevara a cabo con éxito, por lo que se demuestra que existe una inmunidad a F. hepática mediada por anticuerpos.

2.3.- INMUNIDAD ARTIFICIAL

Los intentos para producir una resistencia a la infestación, utilizando homogenizado de duelas adultas, han dado resultados muy variables.

Kerr y Pethovich, 1935 (69), realizaron estudios con objeto de producir en conejos, inmunidad activa frente a F. hepática. Para esto, les inyectaron intraperitonealmente una suspensión al 1% de extracto de Fasciola. Después de una infestación con metacercarias cin-

co semanas más tarde, observaron que existía un cierto grado de inmunidad, comparando con conejos controles que no habían sido inyectados.

Urquhart y col. 1954 (70), usando un antígeno proteico, produjeron una inmunidad artificial frente a F. hepática en conejos. La inmunidad se mostró por una inhibición en el desarrollo de las duelas, pero no hubo reducción significativa en el número de parásitos en los hospedadores inyectados con dicho antígeno.

Inyectando conejos con extracto de F. hepática o con una mezcla del contenido intestinal regurgitado por los parásitos adultos, Healey, 1955 (71), no logró producir una inmunidad artificial.

Ershov, 1959 (72), utilizando un antígeno que consideró como un complejo polisacárido-albúmina, obtuvo inmunidad en ovejas. Sin embargo, esta inmunidad fue parcial, ya que los animales infestados 45 días después de los procesos de inmunización, no mostraron ninguna inmunidad.

Hughes, 1962b, 1963, (73) (74), intentó inmunizar conejos inyectándoles intraperitonealmente antígenos preparados a partir de parásitos adultos liofilizados. El fin experimental fue similar al de Kerr y Pethovich, demostrando un grado de protección que fue significativo estadísticamente, pero no fue confirmado cuando intentó demostrarlo de nuevo, aumentando el número de grupos experimentales.

Este autor, tampoco pudo demostrar diferencias significativas en ovejas.

La acción, en conejos, de extractos obtenidos a partir de estados inmaduros del parásito, fue investigada por Ross, 1967 (75), quien observó un retraso en la infestación a la 6ª y 7ª semana, sin embargo, la extensión del retraso producido, fue considerablemente más grande después de una infestación natural que después de las inyecciones del extracto.

Este mismo autor, implantando adultos viables de 6 semanas en los músculos intercostales de corderos, no logró producir inmunidad artificial.

Inyectando a conejos, con extractos u homogenizados liofilizados de F. hepática, Dragneva, 1974 (76), no logró un grado significativo de inmunidad. Sin embargo, la hiperinmunización con antígenos metabólicos de F. hepática fue más efectiva.

La inactivación parcial de las duelas por radiaciones X, parecía ser prometedora para la producción de una inmunidad artificial, ya que los parásitos tratados con radiaciones X, tienen baja patogenicidad y se desarrollan lo suficiente para inducir una reacción inmune en el hospedador.

Hughes, 1962b (73), fracasó en el intento de demostrar inmunidad en conejos y ratones, infestados con metacercarias tratadas con radiaciones X, a un nivel mínimo de 2 a 4 Kr e infestados más tarde con metacercarias normales.

Dawes, 1964 (77), tampoco pudo demostrarlo en ratones. Los parásitos jóvenes que se recogieron tenían inhibido su desarrollo y encontró también parásitos en varios estados de desintegración.

Esto confirma los hallazgos de Hughes, 1962b (73), 1963 (74), de que los quistes irradiados, dan lugar a formas anormales, de viabilidad limitada y que los límites de irradiación mayores de 3 Kr producen marcadamente la patogenicidad de las duelas jóvenes.

Thorpe y Broome, 1962 (78), trabajando con ratas consiguieron un cierto grado de inmunidad cuando las metacercarias se irradiaron a 1 Kr.

Por otra parte, Armour y col. 1974 (42), inmunizando ratas a intervalos semanales con 2 o 3 dosis de metacercarias tratadas con radiaciones- γ a 3,5 Kr observaron que eran altamente resistentes a una siguiente infestación.

La administración de una o más dosis inmunizantes por vía subcutánea o intraperitoneal, redujo el grado de inmunidad establecido.

Esta inmunidad fue observada también por Nansen, 1974 (79), en becerros vacunados con metacercarias atenuadas mediante un nivel de radiación- γ de 3 Kr.

Otros experimentos de vacunación, fueron realizados por Eriksen y Flagstad, 1974 (80), implantando subcutáneamente en ratas albino, 4 duelas adultas recogidas de los conductos biliares de cabras y ovejas. Tres semanas más tarde, estas ratas, junto con otras no tratadas, se infestaron con metacercarias, observándose que se produce un 50 % de protección.

El hígado estaba intacto, por tanto, la fibrosis no pudo ser responsable de la resistencia a la infestación. Esto indica la existencia de un mecanismo inmunológico, demostrado por la producción de anticuerpos protectores, que estaría estimulado por las duelas que viven sin dañar el hígado. El antígeno que produce esta protección no es conocido, puede ser algún producto metabólico de la duela, huevos del parásito u otro factor desconocido.

La inmunidad producida frente a F. hepática, se expresa en dos caminos: a) retraso en el crecimiento de las duelas que migran en el parénquima, b) reducción en el número de parásitos desarrollados.

Los mecanismos que intervienen en la supresión

de la enfermedad no son conocidos, Dargie y col. 1974 (81), de algunas observaciones experimentales recientes, destacan como importantes los dos siguientes factores:

1) La cantidad de tejido conectivo que existe en el hígado del hospedador.

Animales tales como los cerdos y ganado vacuno parecen poseer un grado de resistencia al parásito relativamente alto, debido a las grandes cantidades de tejido hepático fibroblástico desarrollado después de una infestación natural, que ayuda a atrapar a las duelas jóvenes de una segunda infestación que migran en el parénquima.

2) Mecanismos inmunológicos específicos.

Estos mecanismos son capaces de conferir un grado de protección, que puede ser transferido de unos animales a otros mediante células linfoides de un donador o bien mediante sueros inmunes.

Las células transferidas son linfocitos timo-

dependientes, sensibilizadas frente a antígenos del parásito, que son capaces de iniciar el tipo de inmunidad mediada por células. La transferencia celular va acompañada invariablemente por lesiones hepáticas, asociadas con infiltraciones celulares en torno de parásitos inmaduros muertos.

Por otra parte se ha demostrado, que los anticuerpos circulantes están involucrados en la inmunidad puesto que sueros inmunes inyectados a animales, previamente a la infestación, producen un cierto grado de inmunidad.

Parece pues evidente, que tanto el mecanismo humoral como el celular están implicados en la inmunidad frente a F. hepática.

2.4.- DIAGNOSTICO

Clasicamente, el diagnóstico de la fasciolosis, se basa en la investigación de los huevos del parásito en las heces fecales del supuesto animal parasitado. En el hombre, dicha investigación, suele hacerse también en la bilis, extraída por sondaje duodenal. En ambos casos, si se encuentran huevos y se descarta cuando se trata de humanos, la posible ingestión de hígado distomatósico, se obtiene la absoluta certeza de un parasitismo por F. hepática. Pero si no se observan huevos, la posibilidad de una distomatosis por Fasciola, no queda totalmente eliminada.

Cuando el número de fasciolas es pequeño, los huevos eliminados por la bilis son escasos, por tanto, puede resultar dificultoso encontrarlos en ésta y aún más en las heces. Dicha dificultad es mucho mayor en los animales normalmente hospedadores, que por su condición de hervíboros, eliminan unas heces voluminosas, con abundantes restos celulósicos. De aquí, la necesidad de utilizar métodos de concentración de huevos, que aparte de no resolver totalmente el problema, complican técnicamente el diag-

nóstico y consumen gran cantidad de tiempo.

Por otra parte, desde que un animal se infesta con metacercarias hasta que éstas después de emigrar desde el intestino al hígado, se desarrollan en los canalículos biliares, alcanzan la forma adulta y empiezan la eliminación de huevos, transcurre un largo plazo, en que los exámenes coprológicos y de la bilis son negativos. Es precisamente en esta fase, que en las infestaciones intensas reviste mucha gravedad, cuando los parásitos, emigrando en el interior de los tejidos y especialmente en el parénquima hepático, estimulan más intensamente los mecanismos inmunitarios, que conducen en breve plazo a la producción de anticuerpos séricos y tisulares.

Estas razones, indujeron a buscar en las técnicas inmunológicas el complemento indispensable para un diagnóstico más seguro de la enfermedad, iniciándose las investigaciones y tratando de encontrar el método que en efectividad y sencillez aventajara al examen coprológico y a la ovoscopia en bilis.

Las pruebas inmunológicas se han venido usando

desde hace bastante tiempo. Así, la intradermorreacción ha sido empleada entre otros por Fraga de Azevedo y Carvalho Gomes, 1959 (82), quienes la estudian en el hombre. A tal fin, preparan un extracto total de F. hepática en suero salino estéril. La reacción la efectúan en 80 individuos sanos. De éstos, 6 dieron reacción dudosa y 74 negativa. En un grupo de seis casos de fasciolosis humana, se efectuó la prueba y dió positividad nítida en todos.

Wikerhauser y Bartulic, 1961 (83), han estudiado comparativamente tres antígenos diferentes de Fasciola, para el diagnóstico de la fasciolosis, por pruebas intradérmicas. Estos son los siguientes:

- a) Antígeno somático completo, obtenido por extracción en la solución de Coca.
- b) Antígeno polisacárido obtenido según el procedimiento de Campbell.
- c) Antígeno metabólico, obtenido por incubación de fasciolas vivas en solución de Tyrode a la que se añaden 400 U.I. de penicilina y 400 microgramos de estreptomina por ml. Los tres antígenos los inyectan intracutáneamente a razón de 0,2 ml variando las diluciones, el primero lo diluyen al 1:1.000 el segundo al 1:500 y el tercero no lo diluyen.

Examinan 225 animales, 170 portadores de lesiones distomatósicas y 55 sanos. En los animales parasitados encuentran un 79,5% de positividades con el antígeno metabólico, 63% con el somático y con el polisacárido 39%. Los sanos no dieron reacciones alérgicas positivas.

Pautrizel y col., 1961 (84), usan también la intradermorreacción como prueba de diagnóstico, empleando antígenos preparados en su laboratorio y antígenos comerciales. No encuentran la prueba satisfactoria, pues resultan reacciones falsamente positivas y falsamente negativas.

Maekawa y Kushibe, 1961 (85), prosiguiendo investigaciones anteriores obtienen, por procedimientos químicos, a partir de un extracto, dos alergenos, C₅ y P₄ cuyo principal componente era el ácido ribonucleico.

Ambas fracciones, mostraron casi la misma actividad biológica, dando intradermorreacciones positivas en animales distomatósicos, aún a diluciones en suero salino de 1:100.000.

Maekawa y Kushibe, 1961 (86), estudian la com-

posición del alergeno P₄ demostrando que el 95% es ácido ribonucleico y el 4,6% un péptido.

Los mismos autores, 1964 (87), en un trabajo posterior, dan la supuesta estructura del alergeno P₄. El preparado fue dinitrofenilado sin pérdida de actividad. Cuando el material dinitrofenilado fue sometido a digestión con ribonucleasa y otros enzimas, se obtuvo adenosin-3-fosfato combinado con DNP-péptido. Este, después de hidrólisis con álcali diluido produjo un péptido cuya amina terminal fue histidina.

Favati y Della Croce, 1965 (88), realizan pruebas intradérmicas con antígeno de F. hepática en el ganado y concluyen que son de gran valor en los casos que los exámenes fecales son negativos.

Como puede verse han sido diversos los antígenos empleados para las pruebas alérgicas, lo que en parte explica el desacuerdo en los resultados. A pesar de ello y a través de la experiencia de diversos autores, la intradermorreacción ha demostrado cierto valor diagnóstico que posiblemente se verá aumentado cuando pueda disponerse de

sustancias de composición química bien determinada que se presten a la normalización de la prueba.

Otra de las pruebas inmunológicas empleadas en el diagnóstico de la fasciolosis, es la de fijación de complemento.

Fraga de Azevedo y Carvao Gomes, 1959 (82), efectúan esta reacción, preparando como para la prueba intradérmica, antígeno total al 1%. Prueban varias diluciones de este antígeno contrastando que las mejores diluciones fueron al 1/150 y 1/200. De los seis casos humanos, cinco fueron positivos y uno anticomplementario. De 350 individuos sanos, 306 fueron negativos, 17 fueron dudosos y 27 anticomplementarios.

Benex y col., 1959 (89), investigan el valor de la reacción de fijación de complemento, utilizando extracto salino preparado de duelas adultas. En los ensayos realizados en ovejas, concluyeron que un resultado negativo seguro, excluye la enfermedad, pero que un resultado positivo no indica necesariamente que la enfermedad esté presente.

Pautrizel y Bailenger, 1961 (90), usando antígeno delipidado al 1% hacen un estudio de la fijación de complemento. Este antígeno es extremadamente estable en fase acuosa y más aún liofilizado. Aplican las reacciones según dos técnicas: una de hemólisis efectuada con complemento de cobaya y la otra de conglutinación con complemento de caballo. Para demostrar la sensibilidad de la prueba utilizan 121 sueros de enfermos sospechosos de fasciolosis y concluyen que la técnica de conglutinación es netamente más sensible que la de hemólisis y que se alcanzan más altos títulos con ésta que con aquella.

Yakhontov, 1973 (91), realizó la prueba de fijación de complemento con antígeno polisacarídico de *Fasciola*, en suero de 420 ovejas infestadas con *F. hepática*, de ellos 415 fueron positivos y de 272 sueros de ovejas no infestadas 12 fueron positivos. Comprueba este autor la especificidad usando antígeno de *Ascaris lumbricoides* y *Taenia saginata* y sueros de ovejas infestadas con *Fasciola* o quiste hidatídico y suero de ovejas no infestadas. Los resultados fueron satisfactorios.

Existen otras pruebas serológicas en las que el

antígeno no se usa como tal, sino unido a un soporte de distinta naturaleza.

Muchos han sido los soportes particulares aplicados en la fasciolosis: colessterina (Susumi y col., 1958 (92)); bentonita (Atienza Fernandez, 1965 (93)); látex (Benex, 1964 (94) y Gomez Garcia, 1968 (95)); hematies (Sielicka, 1962 (96), Biguet y col., 1965 (97), Gomez Garcia, 1968 (95), Tribouley y col., 1969 (98)).

Recientemente, se han aplicado las técnicas de Inmunofluorescencia e Inmunolectroforesis al diagnóstico de la fasciolosis.

Desde su introducción, la inmunofluorescencia se ha venido aplicando en el campo de la Parasitología, tanto con fines diagnósticos como para la investigación de antígenos y anticuerpos tisulares.

El método directo corresponde a la técnica original de Coons y col., 1941 (99). Esta modalidad precisa la conjugación con el fluorocromo de cada uno de los sueros estudiados, lo que supone una operación larga y rela-

tivamente delicada, no siendo por tanto utilizable para la investigación de anticuerpos séricos. Por el contrario, se emplea ampliamente para la identificación de microorganismos y antígenos, con la ayuda de inmunisueros específicos conjugados.

En el método indirecto, se pone en contacto el antígeno y el suero a estudiar. Si este último, contiene anticuerpos específicos, éstos se fijan sobre los sitios antigénicos. En la segunda fase de la reacción, el complejo se pone en contacto con un conjugado fluorescente anti-inmunoglobulinas, homólogo con respecto al suero que se está estudiando. De esta manera, un solo suero marcado, se puede utilizar para la investigación de anticuerpos de una especie animal dada, lo que representa una ventaja práctica considerable.

Fraga de Azevedo y Palmira Coelho, 1965 (100), aplican la reacción de inmunofluorescencia al diagnóstico de esta parasitosis. Utilizan la técnica indirecta o del "sandwich" empleando como antígeno, miracidios que incuban en el suero problema, después lavan con tampón de fosfatos y finalmente, tratan con un inmunisuerdo marcado con isotio-

cianato de fluoresceína. Para probar la eficacia de la técnica la ensayan en sueros de individuos sanos y animales normales, en sueros con fasciolosis y de portadores de otras parasitosis. Estos autores llegan a la conclusión de que la inmunofluorescencia constituye una prueba buena tanto en Medicina como en Veterinaria. Obtienen un 74% de positividades en sueros de corderos y un 80% en los casos humanos. Ambos grupos eran portadores de fasciolosis.

Esta técnica, tiene el inconveniente de que hay que obtener los miracidios a partir de los huevos, trabajo que se realiza en 12 a 20 días y necesita numerosas manipulaciones. Teniendo esto en cuenta Coudert y col., 1967 (101), efectúan esta reacción, utilizando como antígeno, cortes de duelas adultas, obtenidos en microtomo de congelación.

Esta reacción se efectúa en láminas y ofrece importantes ventajas prácticas (obtención y conservación fácil de las preparaciones antigénicas, rapidez de ejecución y de lectura de la reacción). La sensibilidad y el valor diagnóstico de este método resultó satisfactorio.

Ambroise-Thomas, 1969 (102), emplea cortes obtenidos enrollando el parásito sobre si mismo y más tarde fragmentos de Fasciola enrollado en músculo estriado. Realizada la reacción en estas condiciones, fue positiva en el 98,1% de los casos y aunque encontró reacciones cruzadas con casos de quiste hidatídico y bilharziosis, éstas, apenas se dan a una dilución de 1/10 y nunca a diluciones más altas.

Kien Troung y col., 1970 (103) emplean también para el diagnóstico serológico de la fasciolosis humana, la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando también como antígeno, cortes de F. hepática adulta. Los resultados en 349 enfermos, arrojan un porcentaje de positividad del 96,5% lo que permite colocar la inmunofluorescencia entre las mejores técnicas de las que disponemos para el diagnóstico serológico de la fasciolosis.

Movsesijan y Borojevic, 1970 (104), detectan anticuerpos en corderos, mediante inmunofluorescencia indirecta, 14 días después de la infestación experimental con metacercarias de F. hepática. Comprobando que la fracción gamma 7s del suero contenía la mayoría de los anticuerpos.

La fluorescencia específica se localiza sobre la superficie de las células epiteliales que revisten el intestino ciego, sobre la superficie del útero, los conductos excretorios, las células espermatozógenas y en el contenido intestinal.

Emplean como antígeno, F. hepática de 90 días preparadas en alcohol etílico frío y xilol y embebidas en parafina. Almacenadas a 4-8° C comprueban que el antígeno conservaba casi completamente sus propiedades antigénicas durante 40 días. Después de este tiempo, decrece constantemente la intensidad de la fluorescencia específica.

Deelder, 1975 (105), aplica la técnica de inmunofluorescencia indirecta a la fasciolosis, utilizando antígenos de *Fasciola* adsorbidos sobre partículas de agarosa.

Teodorovic y col., 1963 (106), aplican por primera vez la técnica de inmunoelectroforesis al diagnóstico de la fasciolosis. Diagnostican la enfermedad en un niño de 9 años en cuyas heces habían sido encontrados huevos de *Fasciola* y era portador de una eosinofilia del 60%. Encuentran un arco de precipitación en la zona de las δ -glo-

bulinas.

Capron y col., 1964 (107), hacen un estudio más amplio de esta técnica afirmando su especificidad, sensibilidad, así como el interés práctico en el control y tratamiento de la fasciolosis humana, enfermedad tan extendida en Francia. Emplean como antígenos: a) extractos totales de F. hepática preparados en una solución 0,018M de ClNa, b) para las reacciones serológicas de control, usan extractos delipidados según la técnica de Pautrizel y col., (90). Emplean así mismo tres tipos de suero: a) sueros experimentales de conejos hiperinmunizados o infestados por vía oral con metacercarias, b) sueros de sujetos afectados de fasciolosis confirmada por exámenes coprológicos o reacciones serológicas, c) sueros testigos de individuos afectados de otras helmintiasis o bien por afecciones no parasitarias.

En la experiencia emplean 14 sueros de individuos con fasciolosis, en 13 de los cuales estaba la enfermedad parasitológicamente confirmada y las reacciones inmunológicas eran positivas. Observan de 2 a 8 arcos de precipitación, no encontrando estos autores relación entre el nú-

mero de arcos y la intensidad de las reacciones serológicas, ni tampoco con la eosinofilia.

De los sueros de enfermos con otras parasitosis distintas de la fasciolosis, solo en un caso de paragonimiasis se reveló un arco de precipitación.

2.5.- ESTRUCTURA ANTIGENICA DE FASCIOLA HEPATICA

El mosaico antigénico de F. hepática ha sido estudiado por la escuela francesa de Biguet. Por inmunodifusión e inmunoelectroforesis de extractos acuosos y salinos de Fasciola, se individualizaron con la utilización de un inmunisuero 15 fracciones antigénicas, 13 de ellas mayores. Del total de fracciones antigénicas, 7 eran proteínas, 2 glucoproteínas y 6 lipoproteínas.

El analisis comparativo de los extractos standard de este Trematode y de los extractos de otros Helminthos, reveló comunidades antigénicas entre ellos. Las fracciones comunes fueron generalmente tres, salvo para el antígeno hidatídico y de A. lumbricoides, que solo presen-

taban una fracción.

De las 15 fracciones antigénicas reveladas, solamente 5 eran específicas, las otras 10 eran compartidas con otros Helmintos. La fracción nº 2 es la de mayor poder antigénico, el anticuerpo correspondiente a ella es el primero que aparece en el curso de la inmunización experimental del conejo y uno de los dos que aparecen en la infestación humana (Biguet, Capron y Tran Van Ky, 1962 (108), Capron y col., 1964 (107)).

Geyer, 1967 (109), encontró 23 fracciones antigénicas activas en un extracto obtenido a partir de Fasciolas por trituración mecánica y extracción acuosa. Estas fracciones fueron de naturaleza proteínica, lipoproteínica y glucoproteínica.

Un estudio sobre los antígenos metabólicos de F. hepática fue realizado por Sewell, 1968 (110). Estos antígenos los obtuvieron manteniendo los parásitos durante varias horas en solución de Earles a 37° C y a razón de 2 ml por parásito. Después de concentración con PEG determinaron la existencia de sustancias proteícas y no pro-

teícas serológicamente activas al ser ensayadas con sueros de animales espontáneamente infestados.

El desarrollo relativamente reciente de la técnica de inmunofluorescencia ha permitido la localización de los antígenos en el interior del parásito. Cuperlovic y col., 1974 (111), han estudiado la antigenicidad de varios estadios de desarrollo de F. hepática. En los huevos existen antígenos en el mismo lugar donde aparece el miracidio. En éste, las sustancias antigénicas se localizan a lo largo de toda la superficie. En las formas jóvenes, la localización tiene lugar en la superficie interna del aparato digestivo, en el epitelio del ciego y en la cutícula. En los adultos, el material antigénico se identifica en la superficie de los epitelios del ciego, en el contenido intestinal, en las células espermatogénicas, en la superficie del útero y los conductos excretores.

Los antígenos revelados a nivel del epitelio intestinal son productos del metabolismo, pues la fluorescencia desapareció o disminuyó considerablemente después de absorber los anticuerpos del suero con productos del metabolismo de las Fasciolas.

El presente trabajo de Tesis Doctoral lo hemos desarrollado en dos partes, una de contenido bibliográfico que ha sido reflejada en el apartado número 2 y otra que expondremos a continuación.

Con la realización de la primera parte, hemos pretendido hacer una puesta al día de los trabajos que hasta ahora se han desarrollado en este importante tema que afecta tanto a la salud humana como a la animal. Los trabajos de revisión bibliográfica que sobre la inmunología de la fasciolosis han aparecido hasta ahora, han estado centrados exclusivamente en el aspecto diagnóstico, por lo que pensamos sería interesante disponer de un trabajo que contemplara todo el conjunto de la inmunología de esta helmintiasis.

En general, los anticuerpos han sido revelados en las secreciones y excreciones como: suero sanguíneo, leche, orina, saliva, lágrimas etc..., pero la bilis, jugando un papel importante en el organismo, está muy poco estudiada bajo el aspecto inmunológico. Por otra parte en la fasciolosis, Fasciola-hospedador es un sistema perfecto para este tipo de estudio. La localización de este pa-

rásito está limitada al hígado, pues su presencia en otros órganos es solamente accidental.

Después de una amplia revisión bibliográfica comprobamos que la bilis de animales parasitados por F. hepática, prácticamente no se había estudiado bajo el aspecto inmunológico. Solamente encontramos un trabajo, (Gajos, 1969 (112)) en el que fue comprobada la presencia de anticuerpos en la bilis de bovinos.

Centrados en este tema, realizamos la parte experimental de este trabajo de Tesis Doctoral, que hemos dividido en dos apartados. En el primero hemos realizado un estudio electroforético e inmunolectroforético de la bilis de ovinos no parasitados por F. hepática, que ha sido el punto de partida para la realización del apartado siguiente, al que sirvió de base. El segundo apartado ha tenido como finalidad el estudio de los componentes antigénicos de F. hepática que pudieran existir en la bilis de animales parasitados y el de los anticuerpos.

3.- ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA BI-
LIS DE ANIMALES PARASITADOS
POR FASCIOLA HEPATICA

3.1.- MATERIAL Y METODOS

3.1.1.- Obtención de los parásitos

Los hígados de ovinos, bovinos y caprinos con intensa fasciolosis, se recogen inmediatamente después del sacrificio del animal en el Matadero Municipal y se trasladan al Laboratorio. En estos hígados, se observan lesiones inflamatorias en los conductos biliares, a veces obstruidos por verdaderos tapones de fasciolas. Por el contrario, en los hígados con calcificaciones, el número de parásitos es mucho menor.

Se extraen los parásitos por disección de los conductos biliares y se lavan 10 o 12 veces en suero salino fisiológico estéril a 37°C para eliminar los restos del contenido intestinal. Se distribuyen en vasos de precipitado conteniendo 200 ml de suero salino estéril (37°C) a razón de 10 o 15 parásitos por vaso. Se cubren con ta-

paderas de cajas Petri y se llevan a la estufa a 37°C durante seis horas. En este periodo de tiempo, se renueva el suero salino cada dos horas. Después de un nuevo lavado con suero salino, se seleccionan los ejemplares que muestren por sus movimientos una perfecta vitalidad. Después de enjugados con papel de filtro, se disponen extendidos en cajas Petri y se guardan a temperaturas inferiores a 0°C si no se van a usar inmediatamente.

3.1.2.- Preparación de los extractos antigénicos. Determinación de su contenido en proteínas

3.1.2.1.- Extracto total de F.hepática

Para preparar este extracto, se seleccionaron las fasciolas que tenían el intestino completamente limpio de restos de bilis, se trituraron en suero salino estéril en un homogeneizador perfectamente limpio y en frío. Una vez trituradas se dejan macerar durante 12 o 14 horas en el frigorífico a 4°C agitando durante este periodo de tiempo de 3 a 5 veces. Se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 20 minutos en centrífuga refrigerada. El supernadante, se distribuye convenientemente en frascos y se guarda en

en el frigorífico.

Se prepararon extractos al 5%, 20%, 40% y 42,8%.

3.1.2.2.- Extractos de hígado de choto y borrego

Se pesan 5 g de hígado de animales de 3 meses de edad, libres de fasciolosis. Se trituran muy finamente en un homogeneizador en frío, con una pequeña cantidad conocida de suero salino estéril, completando después de triturado hasta 50 ml de suero salino. Se dejan macerar durante 12 o 14 horas a 4°C. Después de centrifugar, se recoge el supernadante y se distribuye en frascos que se conservan congelados hasta su posterior uso.

En todos los extractos preparados se hizo determinación del contenido en proteínas. Lo efectuamos por el método del Biuret, modificado por Ferro-Ham, que consiste en lo siguiente:

Reactivo de Biuret.

Pesar 3 g de sulfato de cobre cristalizado (o usar 20 ml del mismo reactivo al 15%); 12 g de tartrato doble de sodio y potasio y 2 g de yoduro potásico. Colocar en un matraz aforado de 2 l. y disolver en aproximadamente 1000 ml de agua destilada.

Con movimiento rotatorio constante añadir 600 ml de hidróxido potásico al 10% (preparado con solución de hidróxido sódico libre de carbonatos). Diluir hasta el enrase y calentar. Este reactivo dura indefinidamente si se conserva en envase Pirex o de poliestireno, pero debe ser descartado si muestra señales de una precipitación rojiza o negra.

Patrón de proteínas.

Usamos el suero Labtrol de Dade Reagents, Inc. (Miami, Florida).

Solución salina.

La empleamos al 0,9%.

Técnica.

Se colocan tres tubos en una gradilla y se vierte en ellos lo siguiente:

| | <u>Tubo Blanco</u> | <u>Tubo Patrón</u> | <u>Tubo Problema</u> |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Suero Labtrol | - | 0,1 ml | - |
| Problema | - | - | 0,1 ml |
| Solución salina | 2 ml | 1,9 ml | 1,9 ml |
| Biuret | 8 ml | 8 ml | 8 ml |

Pasados 30 minutos leemos frente al blanco con una longitud de onda de 540, correspondiente al filtro verde. Con la densidad óptica obtenida y por la fórmula:

$$\frac{\text{Do muestra}}{\text{Do patrón}} \times (\text{concentración proteica patrón}) = \text{Concentración problema}$$

deducimos la concentración proteica de la muestra.

Como generalmente los extractos que nosotros utilizamos son más pobres en proteínas que los sueros, en el tubo problema no ponemos 0,1 ml, sino una cantidad comprendida entre 0,5 y 1 ml. Por ello y para más aproximación en los resultados, ponemos tres tubos problema con cantidades crecientes desde 0,5 hasta 1 ml. Completamos con suero salino hasta 2 ml y agregamos 8 ml de solución de Biuret esperando los 30 minutos. Hacemos la lectura en el fotocolorímetro y para deducir la concentración proteica del extracto aplicamos la siguiente fórmula:

$$C_p = \frac{D_p C_l V_l}{D_l V_p} \quad (II)$$

llamando C_p , a la concentración del problema; D_p , a la densidad óptica del problema; D_l , a la densidad óptica del patrón de suero Labtrol que en nuestro caso, es un volumen fijo, 0,1 ml y V_p , al volumen de extracto utilizado.

Esta fórmula es deducida de la proporcionalidad existente entre la concentración óptica, o sea

$$\frac{\text{Densidad óptica del problema}}{\text{Densidad óptica del Labtrol}} = \frac{C_p}{C_l} \quad (I)$$

Ahora bien, utilizando volúmenes distintos de patrón y problema, tenemos que:

$$C V = C' V'$$

o sea, que la concentración es inversamente proporcional al volumen:

$$\frac{C}{C'} = \frac{V'}{V}$$

Colocando en la fórmula primitiva:

$$\frac{D_p}{D_l} = \frac{C_p V_p}{C_l V_l} \quad ; \quad C_p V_p D_l = D_p C_l V_l$$

Despejando de esta última igualdad C_p , sacamos la fórmula II, quedando demostrada así su deducción.

3.1.3.- Obtención de muestras biliares

Las muestras biliares se obtuvieron por punción aséptica de las vesículas biliares de los animales sacrificados en el Matadero Municipal, se centrifugaron a 1.500

r.p.m. durante 15 minutos y el sedimento se observó microscópicamente para constatar la presencia o ausencia de huevos de Fasciola. Antes de usar la bilis se dializa durante 48 horas frente a suero salino.

3.1.4.- Obtención de sueros de animales espontáneamente infestados

Se recogió la sangre de ovinos y caprinos sacrificados en el Matadero Municipal, junto con las vesículas biliares. Por ovoscopia del sedimento correspondiente a 10 ml de bilis, se comprobó la existencia del parasitismo. Dejando coagular la sangre, se obtuvieron los sueros que se conservaron congelados o liofilizados.

3.1.5.- Obtención de sueros de animales normales

Como sueros normales fueron usados los de conejos nacidos y criados en el laboratorio, libres del parasitismo. También fueron usados como tales los de animales sanos, sin lesiones hepáticas, sacrificados en el Matadero. En éstos, la posibilidad de una fasciolosis ligera, sin lesiones hepáticas aparentes, fue descartada, compro-

bando la ausencia de huevos de Fasciola en el sedimento de la bilis contenida en la vesícula biliar, después de centrifugada. La edad de los animales estuvo comprendida entre 10 días y siete meses.

3.1.6.- Obtención de inmunisueros

3.1.6.1.- Preparación de sueros anti-extracto total de Fasciola hepática

En su preparación se siguió la siguiente pauta: Por sección venosa auricular, se obtuvo sangre de cuatro conejos, cuyo peso osciló entre 4,5 y 5 Kg.

De los cuatro conejos, dos fueron inyectados con una cantidad de extracto equivalente a 6 mg de proteínas, en días alternos. Otro conejo fue también inyectado en días alternos pero con una cantidad de extracto equivalente a 6,5 mg de proteínas.

En estos tres conejos junto con el antígeno se inyectaron 2 ml de suero salino que contenía 25.000 U.I. de penicilina y 0,25 g de estreptomina por ml. Sangrias

de prueba fueron realizadas en días alternos, comprobando en cada suero el nivel de anticuerpos por inmunodifusión e inmunolectroforesis.

En el cuarto conejo, las inmunizaciones se efectuaron con adyuvante completo de Freund y 25 mg de extracto antigénico. Este peso del extracto liofilizado, fue disuelto en 1 ml de suero salino, al cual se le añadió un volumen igual de adyuvante. Una vez bien emulsionada, la mezcla fue inyectada en varios sitios del lomo del animal. Las inyecciones fueron repetidas semanalmente. El suero de este animal mostró un nivel bajo de anticuerpos por lo que no lo hemos utilizado en nuestras experiencias.

3.1.6.2.- Preparación de sueros anti-bilis normal

En la preparación de estos inmunisueros, utilizamos la bilis obtenida de borregos libres de Fasciola. El supernadante, obtenido después de centrifugación, se liofilizó, concentró al 1/4 y dializó 4 días frente a suero salino. Después de una nueva liofilización, 25 mg de esta bilis fueron preparados con adyuvante de Freund e inyectados a un conejo, siguiendo la pauta señalada en el

CUADRO nº II

Fechas de las sangrias realizadas en seis conejos para la obtención de sueros inmunes

| Conejos | Sangrias | | | | | | | | | | |
|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| CF-1 | 17/7/73 | 19/7/73 | 21/7/73 | 23/7/73 | 25/7/73 | 27/7/73 | 30/7/73 | | | | |
| CF-2 | 10/9/73 | 11/9/73 | 12/9/73 | 14/9/73 | 16/9/73 | 18/9/73 | 20/9/73 | 22/9/73 | 24/9/73 | 25/9/73 | 26/9/73 |
| CF-3 | 10/1/76 | 14/1/76 | 16/1/76 | 18/1/76 | 20/1/76 | 22/1/76 | 24/1/76 | 26/1/76 | 28/1/76 | 30/1/76 | 1/2/76 |
| CF-4 | 21/12/73 | 28/12/73 | 4/1/74 | 11/1/74 | 18/1/74 | | | | | | |
| CS-5 | 29/10/74 | 31/10/74 | 2/11/74 | 4/11/74 | 6/11/74 | 8/11/74 | 10/11/74 | 12/11/74 | 14/11/74 | 16/11/74 | 18/11/74 |
| CB-6 | 4/1/74 | 11/1/74 | 18/1/74 | 25/1/74 | 1/2/74 | 8/2/74 | 15/2/74 | 22/2/74 | | | |

CUADRO nº I

Inmunizaciones efectuadas en seis conejos para la obtención de sueros inmunes

| Conejos | Antígenos | Inyecciones | | | | | | | | | |
|---------|------------------------|-------------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| CF-1 | ETF (s.a.) (6 mg) | 17/7/73 | 19/7/73 | 21/7/73 | 23/7/73 | 25/7/73 | 27/7/73 | 30/7/73 | | | |
| CF-2 | ETF (s.a.) (6,5 mg) | 10/9/73 | 11/9/73 | 12/9/73 | 14/9/73 | 16/9/73 | 18/9/73 | 20/9/73 | 22/9/73 | 24/9/73 | 25/9/73 |
| CF-3 | ETF (s.a.) (6 mg) | 10/1/76 | 12/1/76 | 14/1/76 | 16/1/76 | 18/1/76 | 20/1/76 | 22/1/76 | 24/1/76 | 26/1/76 | 28/1/76 |
| CF-4 | ETF (c.a.) | 21/12/73 | 28/12/73 | 4/1/74 | 11/1/74 | 18/1/74 | | | | | |
| CS-5 | SB (s.a.) | 29/10/74 | 31/10/74 | 2/11/74 | 4/11/74 | 6/11/74 | 8/11/74 | 10/11/74 | 12/11/74 | 14/11/74 | 16/11/74 |
| CB-6 | BN (c.a.) | 4/1/74 | 11/1/74 | 18/1/74 | 25/1/74 | 1/2/74 | 8/2/74 | 15/2/74 | 22/2/74 | | |

ETF= Extracto total de Fasciola hepática

SB= Suero de borrego

BN= Bilis normal

s.a.= sin adyuvante

c.a.= con adyuvante

apartado anterior.

3.1.6.3.- Preparación de sueros anti-suero de borrego

Un conejo fue inyectado en días alternos con una cantidad de suero de borrego sano, equivalente a 5 mg de proteínas. Este borrego, no tenía lesiones hepáticas y en él se comprobó la ausencia de huevos de Fasciola en el sedimento de la bilis. El número total de inyecciones fue de 10.

El número y fechas de las inyecciones efectuadas en la totalidad de los conejos están anotados en el Cuadro número I y el número y fechas de las sangrías, en el Cuadro número II.

La primera fecha corresponde a la sangría efectuada antes de la primera inyección, al objeto de obtener sueros normales, que nos servirán como controles negativos.

La Lámina I muestra fotografías de algunos de los inmunolectroforegramas obtenidos con los inmunisue-



ros y sus antígenos homólogos.

3.1.6.4.- Sueros anti-albúmina y anti-gamma globulinas ovina

Como suero anti-albúmina ovina hemos utilizado uno de los preparados con anterioridad en nuestro laboratorio.

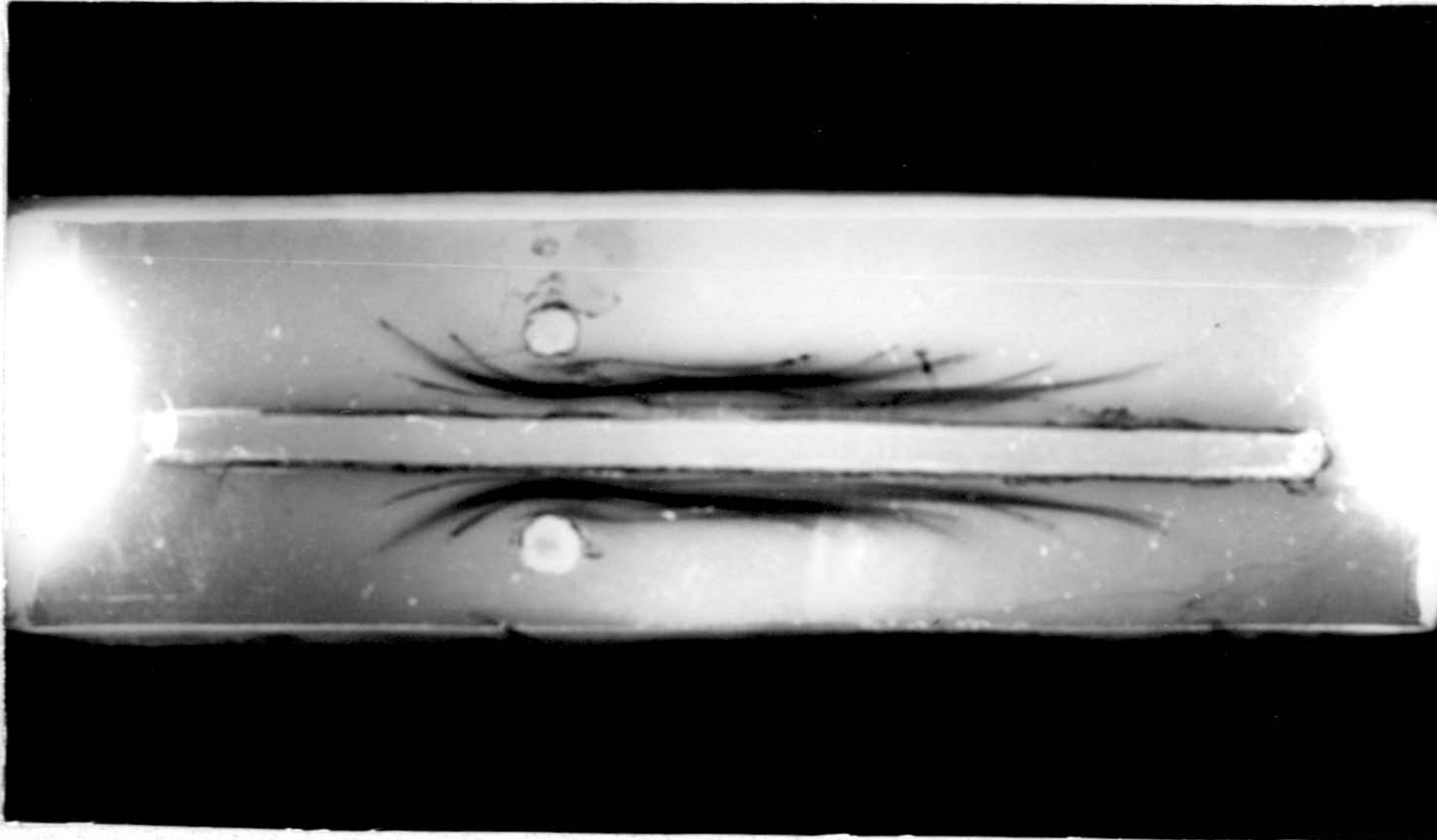
El suero anti-gamma globulinas ovina, procedía de la casa SYCCO, Silvana Millburn, N.J. Estos sueros habían sido obtenidos en conejo.

3.1.7.- Técnicas de electroforesis, inmunodifusión e inmu-
noelectroforesis

3.1.7.1.- Electroforesis

Para realizar esta prueba seguimos la microtécnica de Grabar y Willians, que utilizan como soporte un gel de agarosa al 1%. El tiempo normal empleado es de 2 horas y el potencial de 150 V.

LAMINA I



Inmunoelectroforesis de extracto total de Fasciola frente a suero anti-extracto total de F. hepática.

Inmunoelectroforesis de suero de borrego, frente a suero anti-suero de borrego.

Después de realizada la electroforesis y una vez fijados y secos los portas, éstos se tiñen con un colorante adecuado para la caracterización química de los componentes que se estudian.

Nosotros hemos empleado para la caracterización de proteínas, Negro amido o Rojo ponceau, cuya composición es la siguiente:

Negro amido, Rojo ponceau ----- 4 g
Metanol-acético (9:1) ----- 1000 ml

Las placas se sumergen durante un minuto en esta solución de colorante y a continuación se lavan durante dos horas en ácido acético al 10%. Después del lavado se dejan secar las placas a temperatura ambiente.

Para la caracterización de lípidos hemos utilizado una solución de Negro Sudán preparado de la siguiente forma:

Solución saturada en alcohol al 60% (aproximadamente 1 g de colorante por litro de solución de alcohol). La saturación se consigue en una estufa a 37° durante un periodo de 16 a 24 horas, agitando de vez en cuando. Cuan-

do la solución ha alcanzado la temperatura ambiente se filtra y guarda en frascos de cristal oscuro.

Inmediatamente antes de usarlo se añade hidróxido sódico al 30% en la proporción de 0,1 ml por cada 160 ml de solución de Negro Sudán.

Las placas se tiñeron durante dos horas en la solución colorante y después se bañaron dos veces sucesivas en alcohol al 50% durante 15 minutos cada vez. A continuación se dejaron secar al aire.

3.1.7.2.- Inmunodifusión

Seguimos la técnica de micro-doble-difusión de Gonzalez Castro y col. 1966 (113), empleando como soporte una solución de agarosa al 1%, preparada en suero salino estéril.

Los portas donde se va a realizar la prueba se preparan igual que en la electroforesis, para que al depositar el gel de agarosa y una vez solidificado no se desprenda del porta.

A cada extremo del borde lateral del porta y a la distancia conveniente se colocan unas láminas de plástico de 4 mm de grosor que marcan un cuadrado en el centro del porta. Una vez colocadas estas, la agarosa se deposita en la superficie señalada e inmediatamente después se coloca sobre la agarosa fundida una plantilla de plástico de superficie completamente lisa. Se espera a que la agarosa solidifique y por desplazamiento lateral se retire aquella.

Sobre la agarosa solidificada se colocan unas matrices de plástico que llevan perforados orificios, donde se colocan los reactivos. Nosotros empleamos matrices de cinco orificios, uno central y los otros cuatro lateralmente formando un cuadrado.

En el orificio central colocamos el suero y en los laterales las soluciones antigénicas. A veces la proporción óptima de antígeno/anticuerpo no se consigue empleando estas matrices, por lo que es preciso perforar en la superficie de agarosa orificios de distinto tamaño, pudiendo así aumentar la cantidad de uno o de ambos reactivos hasta que estos se encuentren en la proporción adecuada.

da para dar una línea de precipitación nítida.

En las Láminas II y III, se pueden observar fotografías de las distintas modalidades de orificios que hemos utilizado.

3.1.7.3.- Inmunolectroforesis

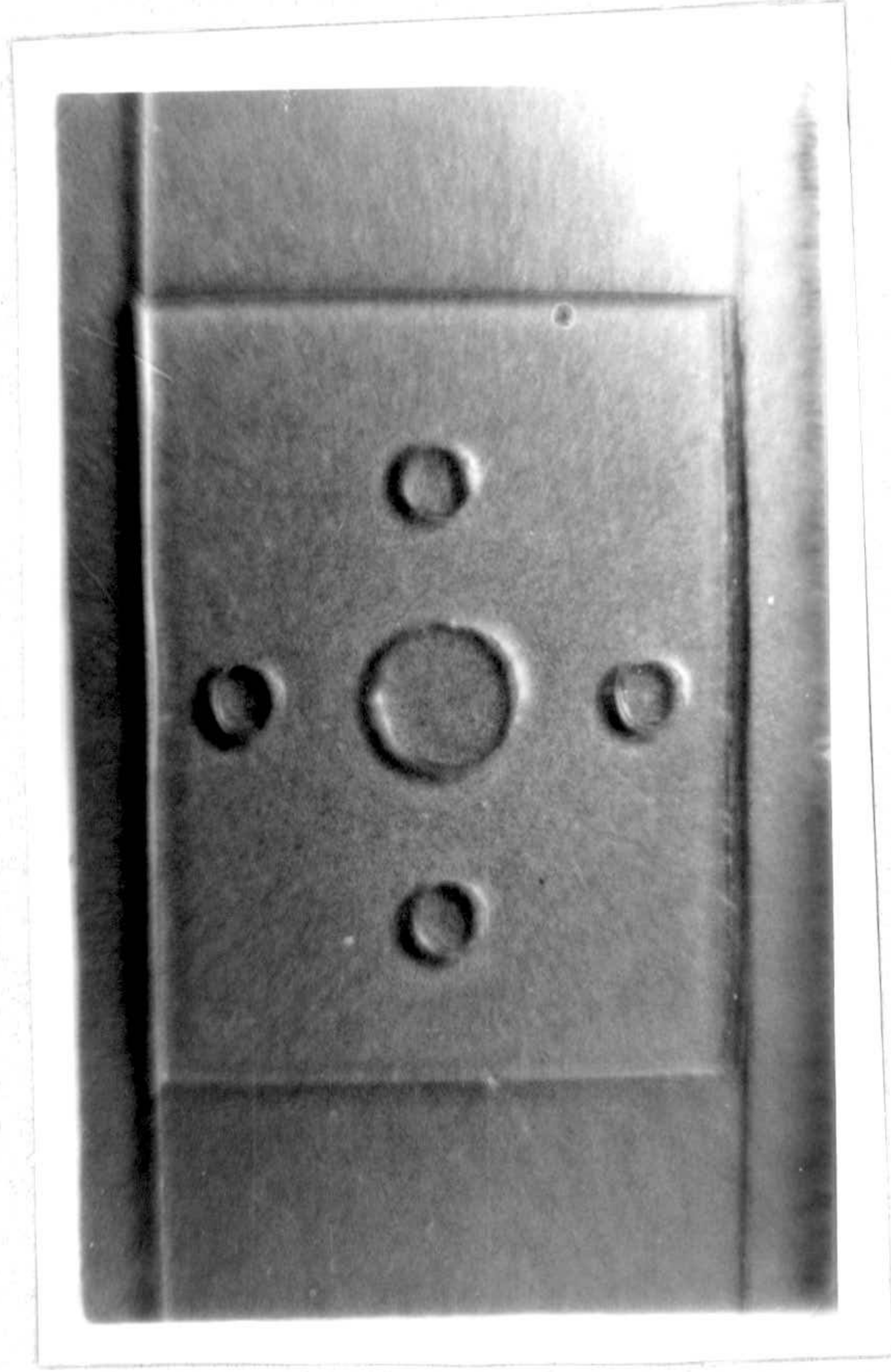
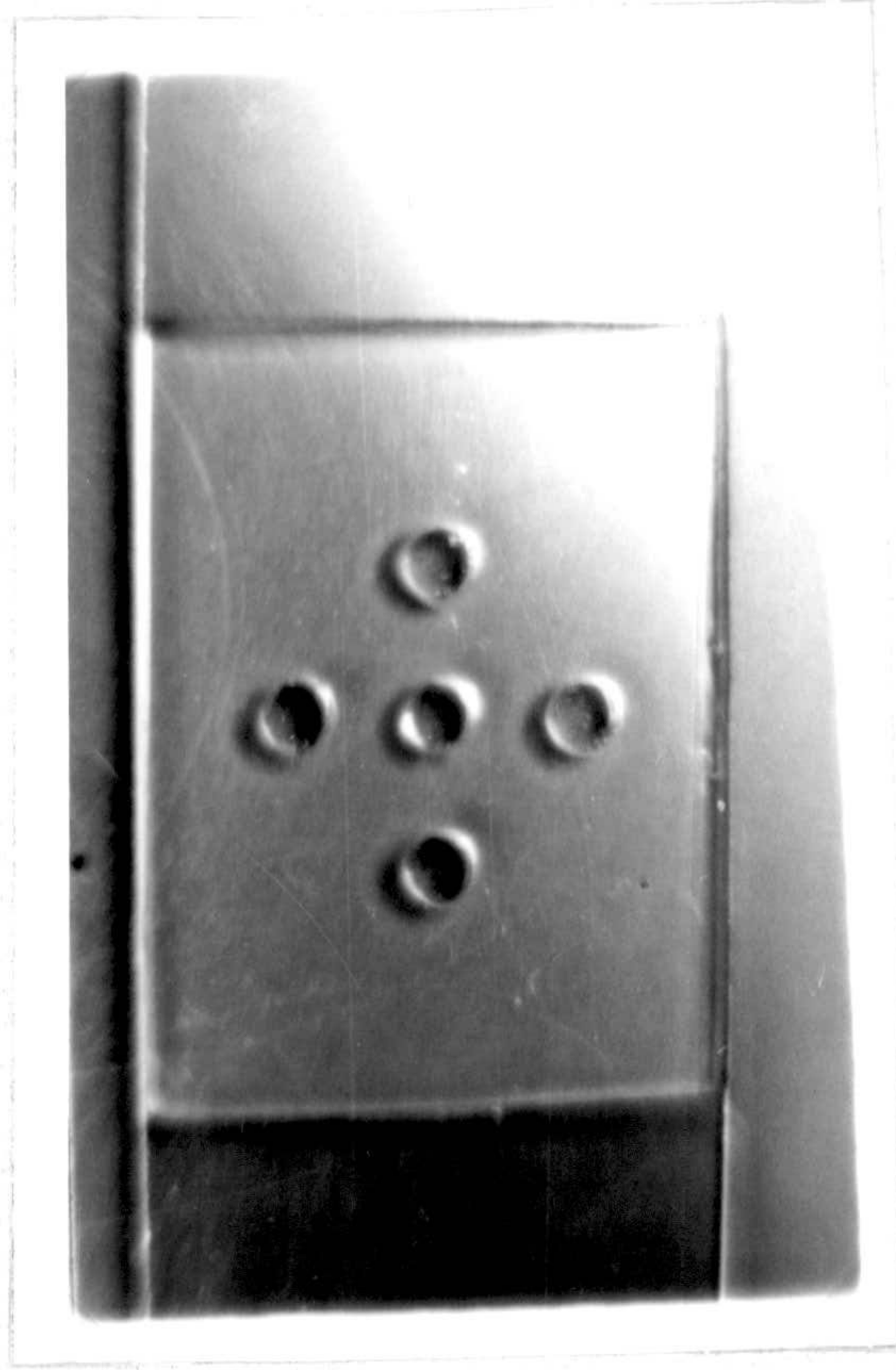
La realizamos siguiendo también la técnica de Gonzalez Castro y col. 1966 (113).

Los portas se preparan de la misma forma que indicamos anteriormente para la electroforesis.

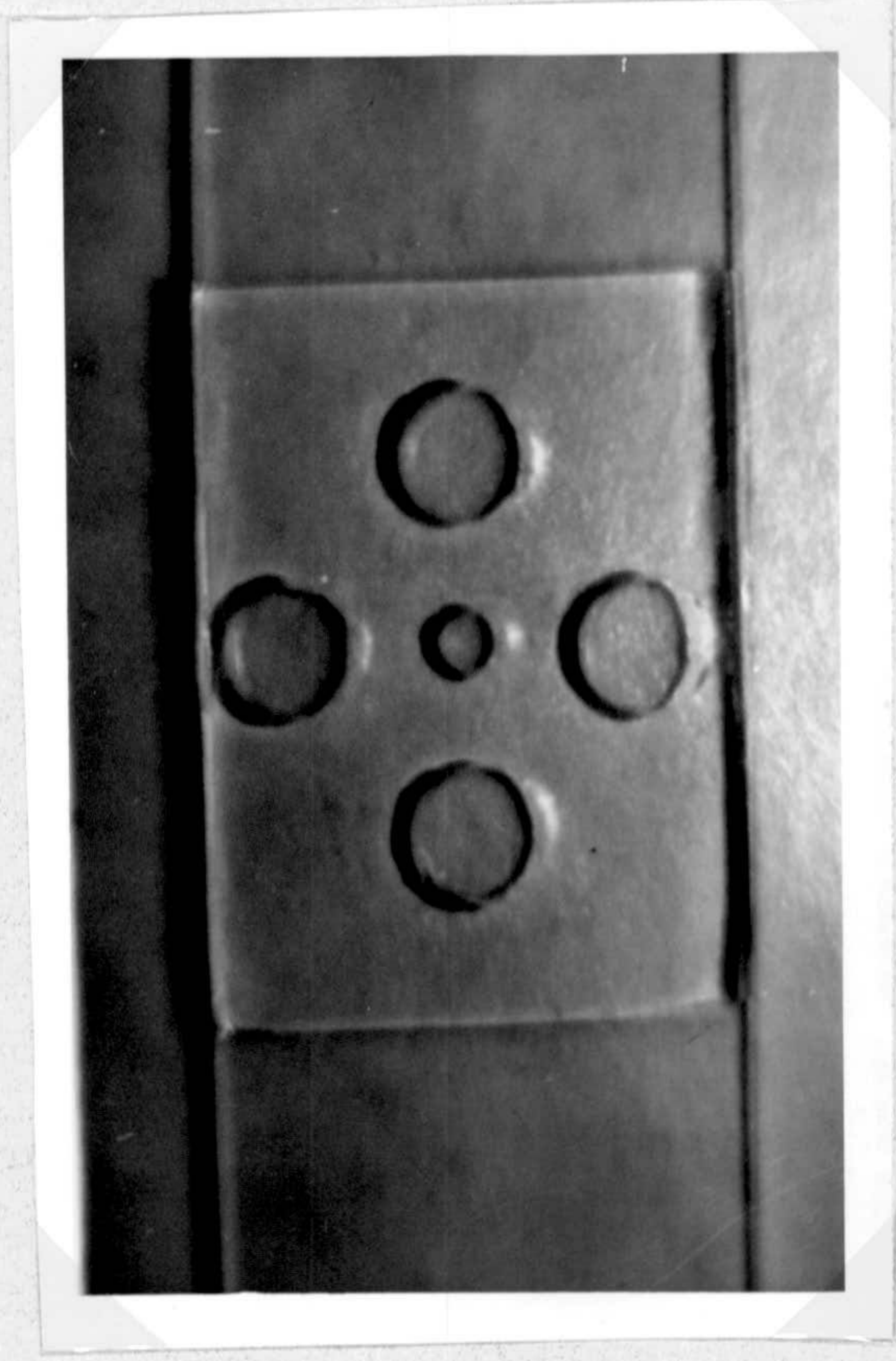
En la agarosa se practica un canal central a lo largo del portaobjetos, donde se coloca el suero y dos orificios laterales, (reservorios del antígeno), no exactamente en el centro de la placa, sino desplazados 3 mm hacia uno de los extremos. Este extremo, debe situarse siempre hacia el lado del electrodo negativo.

Primero realizamos la electroforesis de la muestra. A continuación, se rellena el canal con el suero. Las

LAMINA II



LAMINA III



placas se colocan en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los antígenos y anticuerpos presentes en el gel difunden en el seno de éste y cuando se encuentran en la proporción adecuada producen complejos insolubles que precipitan. Estos precipitados se disponen en el gel como bandas más o menos elipsoidales. El completo desarrollo de estas bandas se obtiene en un plazo de 12 a 72 horas.

Como las proporciones no son simultáneamente idénticas para todos los componentes en una mezcla de antígenos ni en un inmunisero, para detectar el máximo número de componentes de una muestra, realizamos varias pruebas paralelas con distintas proporciones de los reactivos y distinto tamaño de los orificios laterales al canal.

Después que aparecen los arcos de precipitación se procede a la tinción de los mismos para la conservación de las placas. El proceso es igual al que describimos para la electroforesis, solo que aquí, no es necesaria la fijación, ya que los complejos antígeno-anticuerpo específicos, detectables por este método, son precipitados que no son solubles en el medio de la reacción. Sin embargo,

antes de la tinción, es necesario lavar las placas durante tres días en agua destilada, renovandola dos o tres veces al día. La finalidad de este lavado es eliminar el exceso de antígeno y anticuerpo que no hayan reaccionado. Después se secan las placas y se tiñen con colorantes que tengan afinidad por las proteínas, como son Negro amido o Rojo ponceau.

3.1.8.- Precipitación de gamma-globulinas con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

En un tubo de centrífuga colocamos 10 ml de bilis a los que se le añade gota a gota 10 ml de solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ mezclando bien a medida de la adición. Se deja reposar veinte minutos, colocando el tubo en un baño de hielo. Pasado este tiempo, se centrifuga en centrífuga refrigerada, durante 15 minutos a 3.000 r.p.m. Se decanta y recoge el sedimento que se suspende en 1 ml de suero salino. A este volumen, se le añade otro igual de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, repitiendo esta misma operación tres veces. El último precipitado, se redisuelve en 3 ml de suero salino. Posteriormente, se realiza una dialisis frente a buffer borato. Cambiando el buffer por la mañana y tarde hasta que éste no muestre iones sulfato con una

solución de Cl_2Ba .

La solución proteica una vez dializada se conserva congelada hasta su uso.

4.- R E S U L T A D O S

4.1.- ANALISIS ELECTROFORETICO E INMUNOELECTROFORETICO DE LA BILIS VESICULAR OVINA

Experiencia nº 1

Esta primera experiencia tuvo por objeto la localización electroforética de los componentes biliares y determinación de su naturaleza química mediante tinciones específicas.

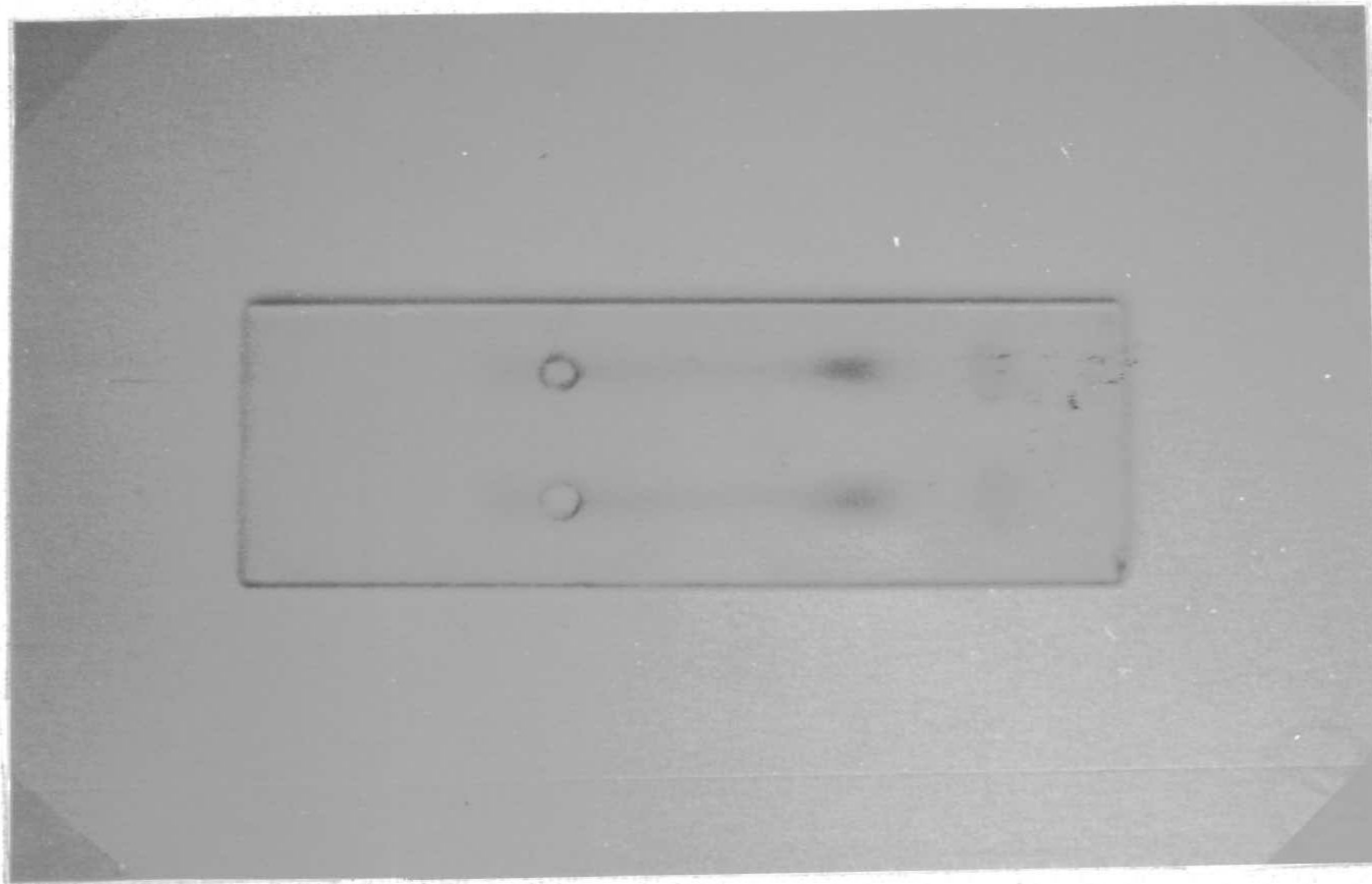
Utilizamos bilis concentrada al 1/4 por liofilización y dializada durante 48 horas frente a suero salino. La electroforesis se realizó a 150 V, durante dos horas, empleando como soporte agarosa preparada al 1% en tampón veronal-veronal sódico, pH 8,6. Después de realizada la electroforesis, los portas se sumergieron en ácido acético al 2% durante 3 horas, para fijar los componentes al gel. Una vez fijados, se hizo tinción específica para proteínas con Rojo ponceau y Negro amido. La decoloración se hizo con ácido acético al 10% durante dos horas.

- Se observaron cinco componentes proteicos, que en orden a la rapidez de migración hacia el ánodo fueron:
- 1º) Una fracción que migra rápidamente. Tiene forma de arco y se encuentra ligada a la bilirrubina.
 - 2º) Otra fracción con movilidad semejante a la albúmina del suero.
 - 3º) Una zona alargada, que se corresponde con la zona de movilidad alfa y beta globulinas del suero.
 - 4º) Una fracción localizada en el punto de partida. Esta localización parece corresponder a la zona de las gamma globulinas séricas.
 - 5º) Una fracción de clara migración catódica, cuya movilidad no se asemeja a ninguna fracción del suero. (Lámina IV A).

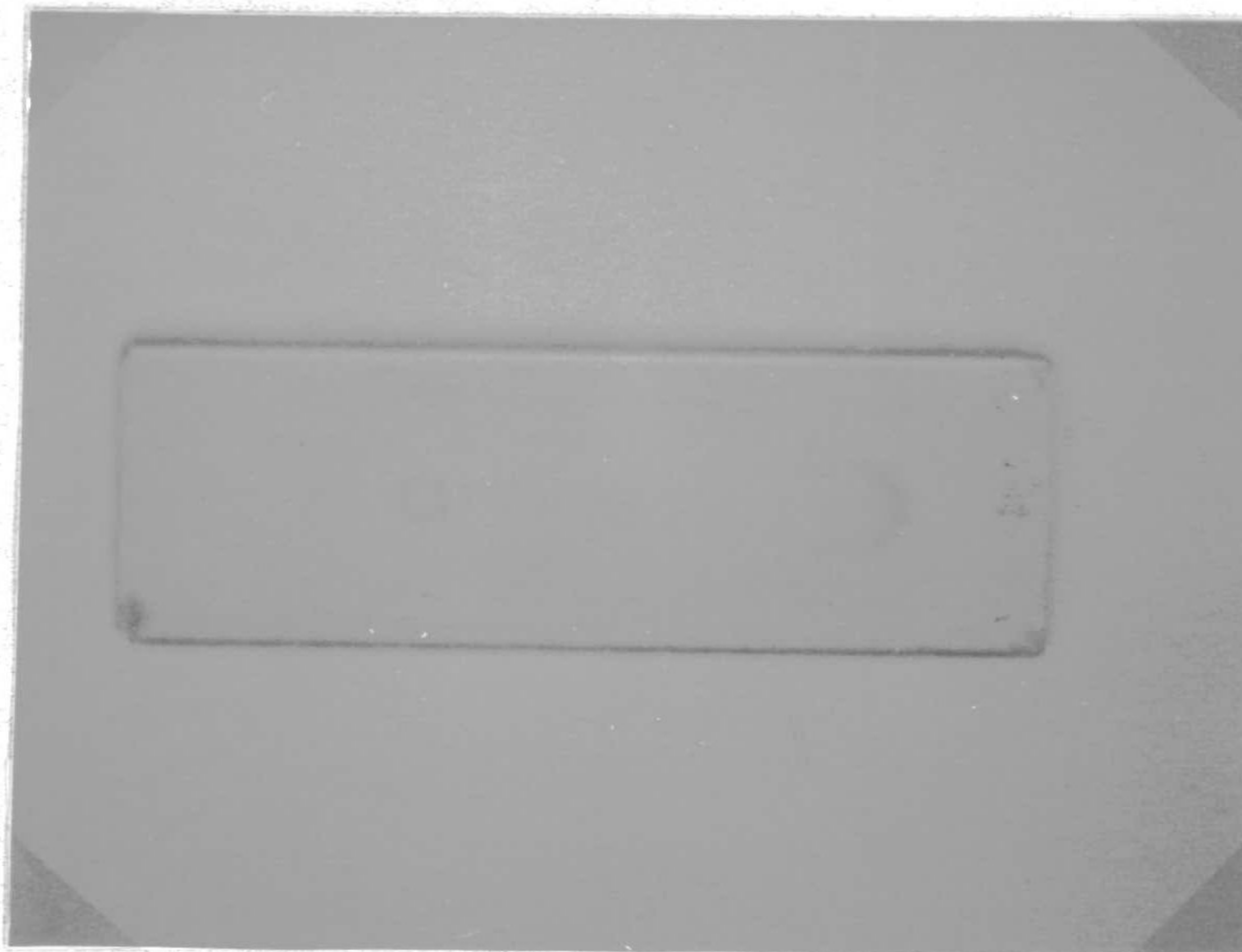
Para la determinación de los componentes lipídicos, se hizo tinción con Negro Sudán B y decoloración con etanol al 50%. Encontramos una fracción que se encuentra ligada a la fracción proteica que migra más rápidamente hacia el ánodo y tiene forma de arco. Esta fracción primera es pues un complejo lipoproteína-pigmento. (Lámina IV B).

Aparte de este pigmento ligado a proteínas y lí-

LAMINA IV



- A -



- B -

pidos, existe otro localizado en la zona de las alfa globulinas del suero.

Experiencia nº II

En esta experiencia se ensayaron, por inmunoelectroforesis, todos los sueros obtenidos del conejo CB-6, que había sido inmunizado con bilis vesicular ovina. Su finalidad fue comprobar con que suero o sueros obteníamos el mayor número de arcos de precipitación. Un total de 14 arcos fueron obtenidos con los sueros de las sangrías 6ª y 7ª.

Experiencia nº III

Fue montada al objeto de determinar los componentes antigénicos biliares. Para ello utilizamos bilis de ovinos que no estaban parasitados por F. hepática y las probamos por inmunoelectroforesis con los sueros anti-bilis de las sangrías 6ª y 7ª, concentrados al 1/2.

En los portas se hicieron dos tipos de reservorios de antígeno, uno con diámetro de 3 mm y otro de 5 mm.

Cuando utilizamos el reservorio mayor detectamos 12 arcos de precipitación. Al emplear el reservorio menor, observamos menos arcos de precipitación pero aparecen dos nuevos al nivel del complejo lipoproteína-pigmento. Por tanto consideramos que el número de constituyentes observados por nosotros es de 14.

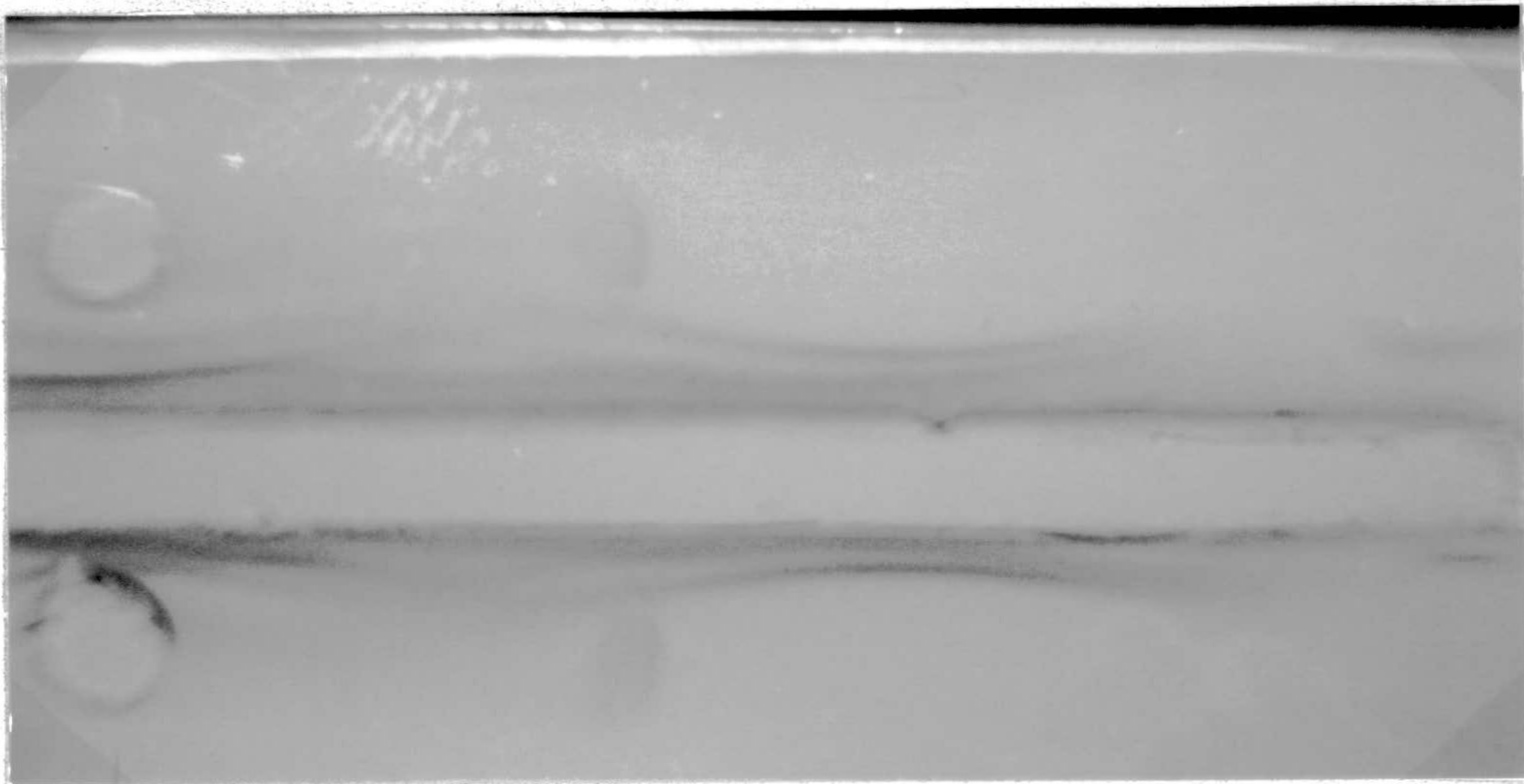
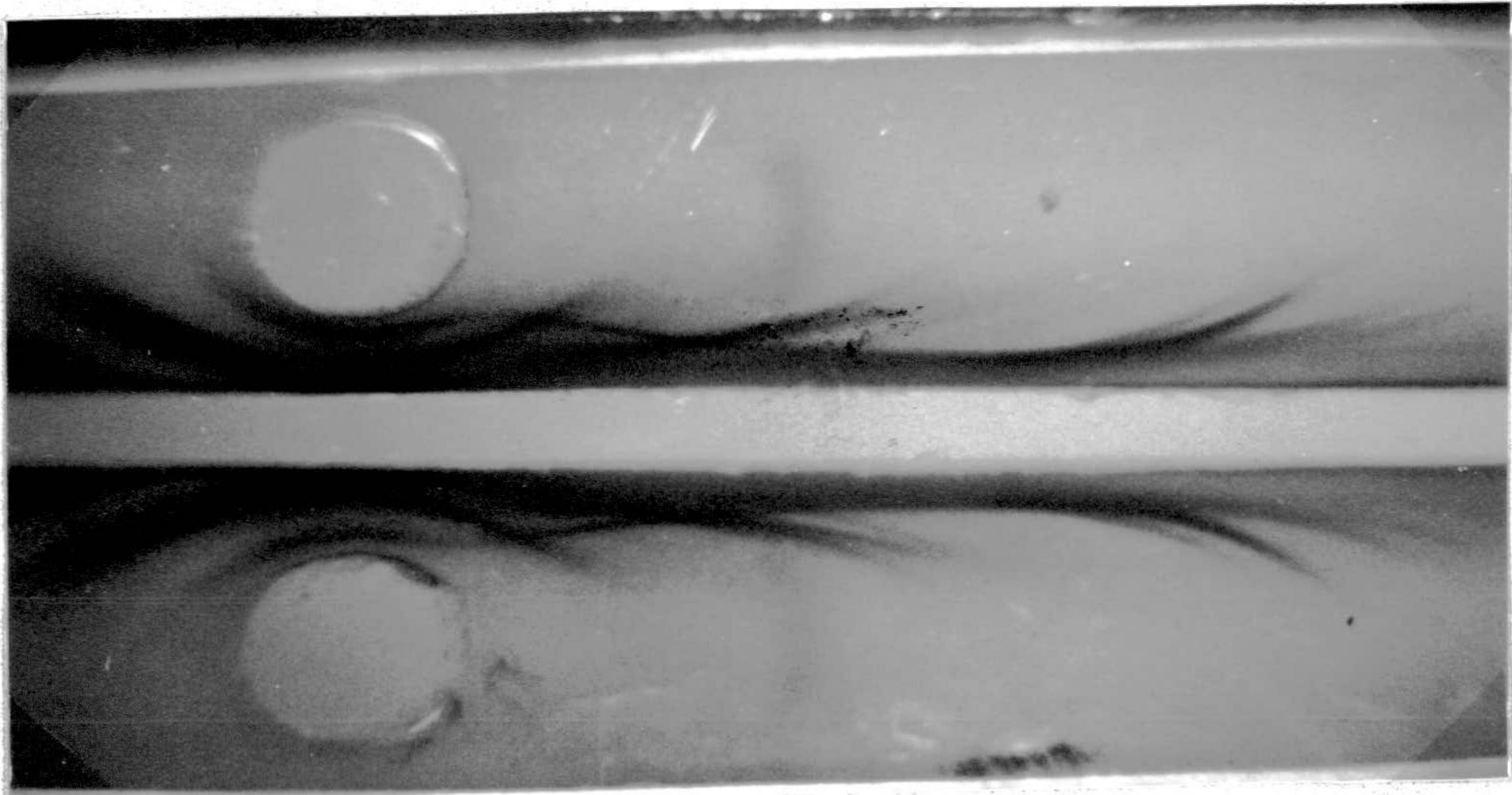
La Lámina V, muestra las electroforesis con el orificio de 5 mm y con el de 3 mm; en esta última se pueden observar las dos bandas al final del canal.

En la Lámina VI, representamos un esquema con los 14 arcos totales obtenidos.

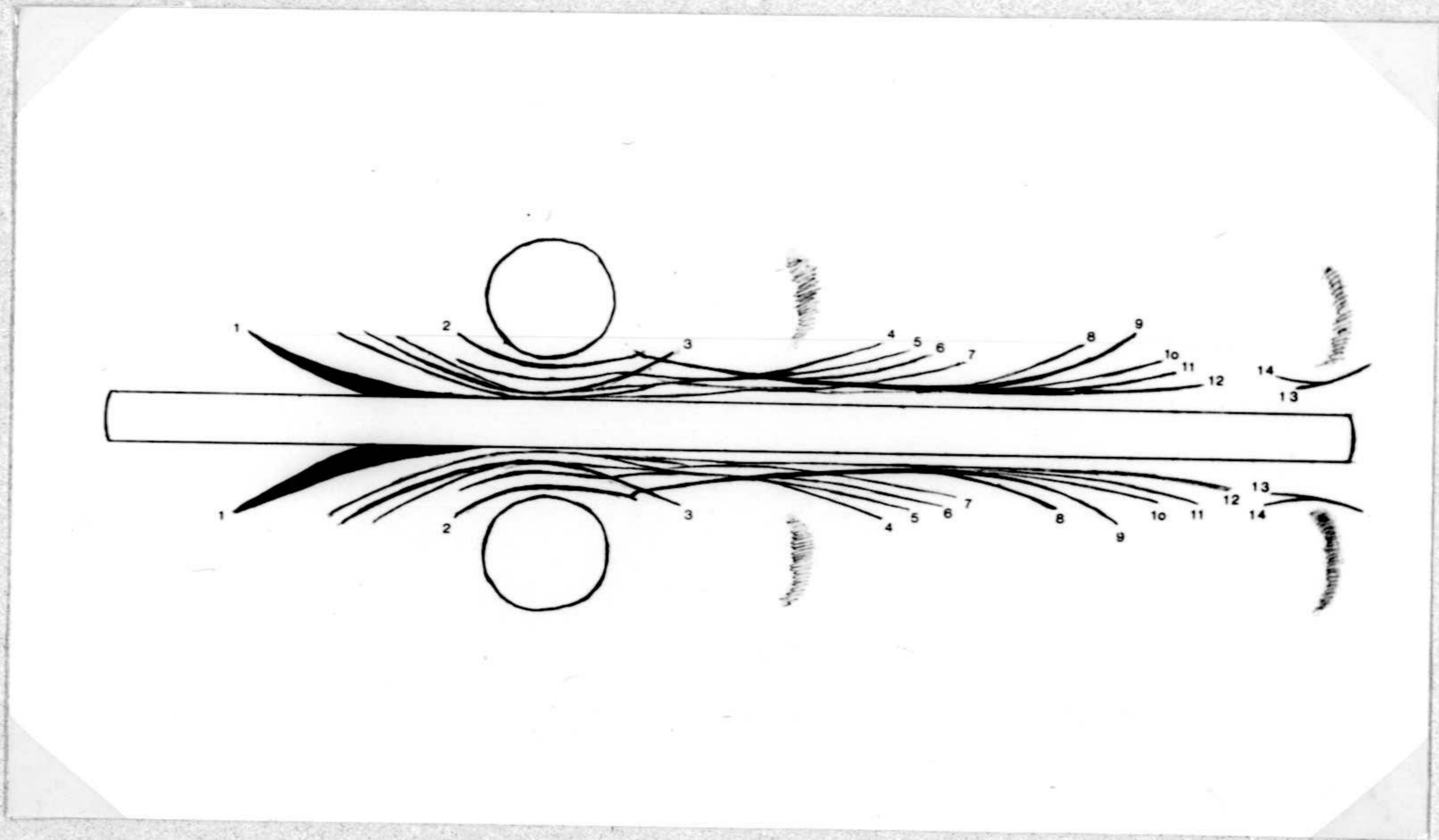
Experiencia nº IV

Fue una repetición de la anterior, pero en lugar de utilizar una sola muestra de bilis se reunieron 30 de ellas que fueron ensayadas frente al inmunisero homólogo. Con la utilización de esta mezcla de bilis quisimos comprobar si el número de arcos de precipitación aumentaba. Una vez realizada la inmunolectroforesis comprobamos la existencia de 14 arcos de precipitación, número igual al

LAMINA V



LAMINA VI



Esquema que representa los arcos totales obtenidos por inmunolectroforesis de bilis ovina normal frente a suero anti-bilis.

obtenido anteriormente.

Experiencia nº V

En la bilis existen componentes antigénicos comunes con el suero y otros que son específicos. La determinación de estos componentes específicos fue la finalidad de esta experiencia.

El suero anti-bilis se dejó absorber con suero ovino normal en exceso durante toda la noche a 4°C. Después de centrifugar la mezcla el supernadante se concentró cuatro veces, por filtración a través de una membrana MINICON-S125.

Con el suero absorbido y concentrado, hicimos inmunolectroforesis empleando por una parte bilis vesicular y por otra suero ovino normal. De esta manera comprobamos que la absorción había sido buena ya que el suero ovino no reveló ningún arco de precipitación. Por el contrario, con la bilis vesicular aparecieron 8 arcos de precipitación, correspondientes a otros tantos antígenos propios de la bilis. Estos antígenos biliares, con respecto

a la electroforesis realizada en la primera experiencia, se localizaron de la siguiente forma: tres en la zona de la albúmina, otros tres en la zona de las alfa y beta globulinas y dos en la zona de las gamma globulinas y de la quinta fracción.

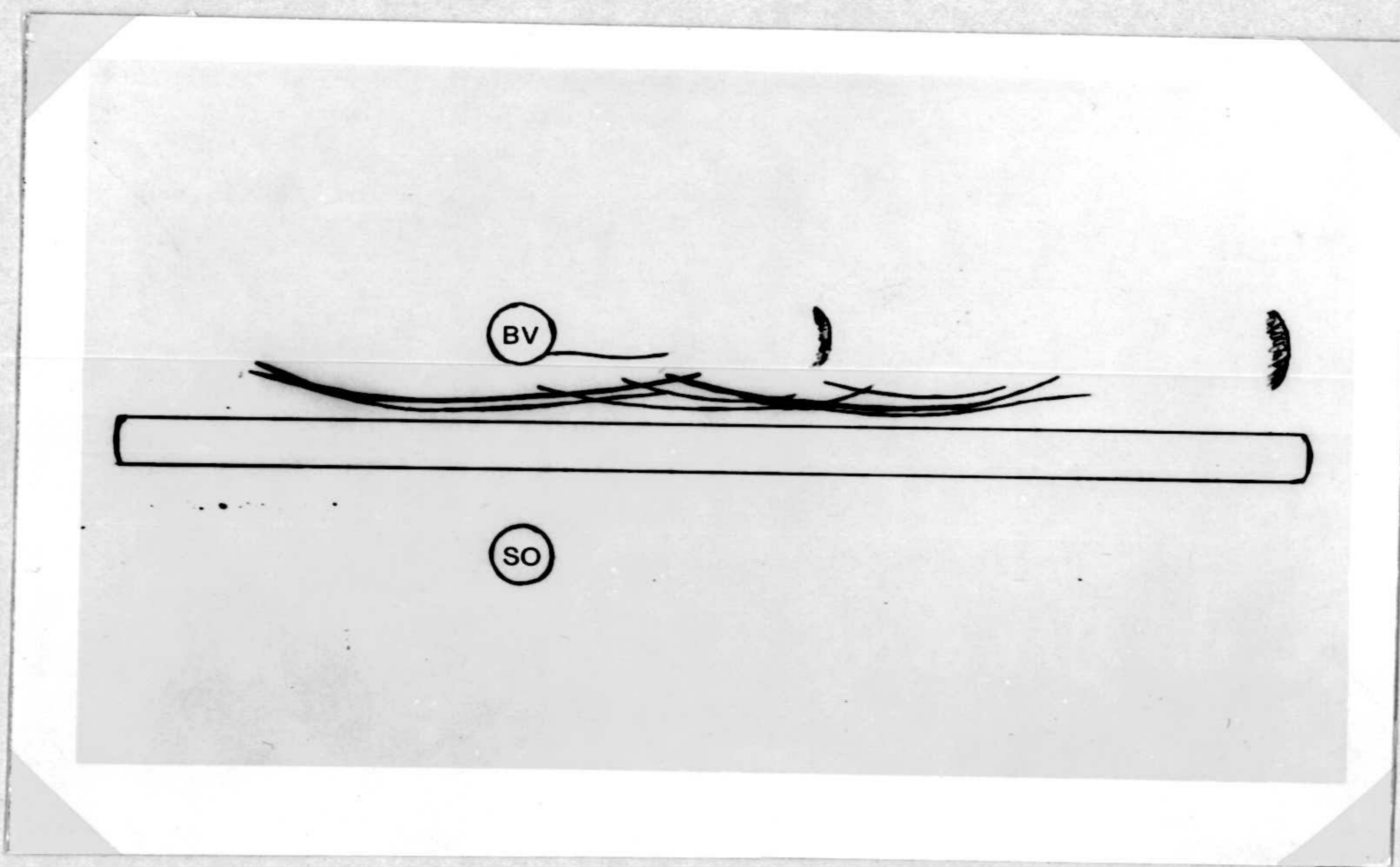
La Lámina VII, muestra un esquema de esta inmunolectroforesis.

Experiencia nº VI

Esta experiencia fue realizada para investigar los antígenos biliares comunes con los del suero sanguíneo. Con tal fin hicimos inmunolectroforesis de bilis vesicular ovina, frente a un inmunisero de suero ovino normal. El inmunisero lo utilizamos a distintas concentraciones: diluido al 1/2, normal, concentrado al 1/2 y 1/4. Los reservorios destinados a la bilis fueron realizados con los mismos diámetros que en la experiencia nº III. El número máximo de arcos de precipitación obtenidos fue de 6.

Con respecto a la electroforesis de la bilis, estos antígenos estuvieron localizados de la siguiente ma-

LAMINA VII

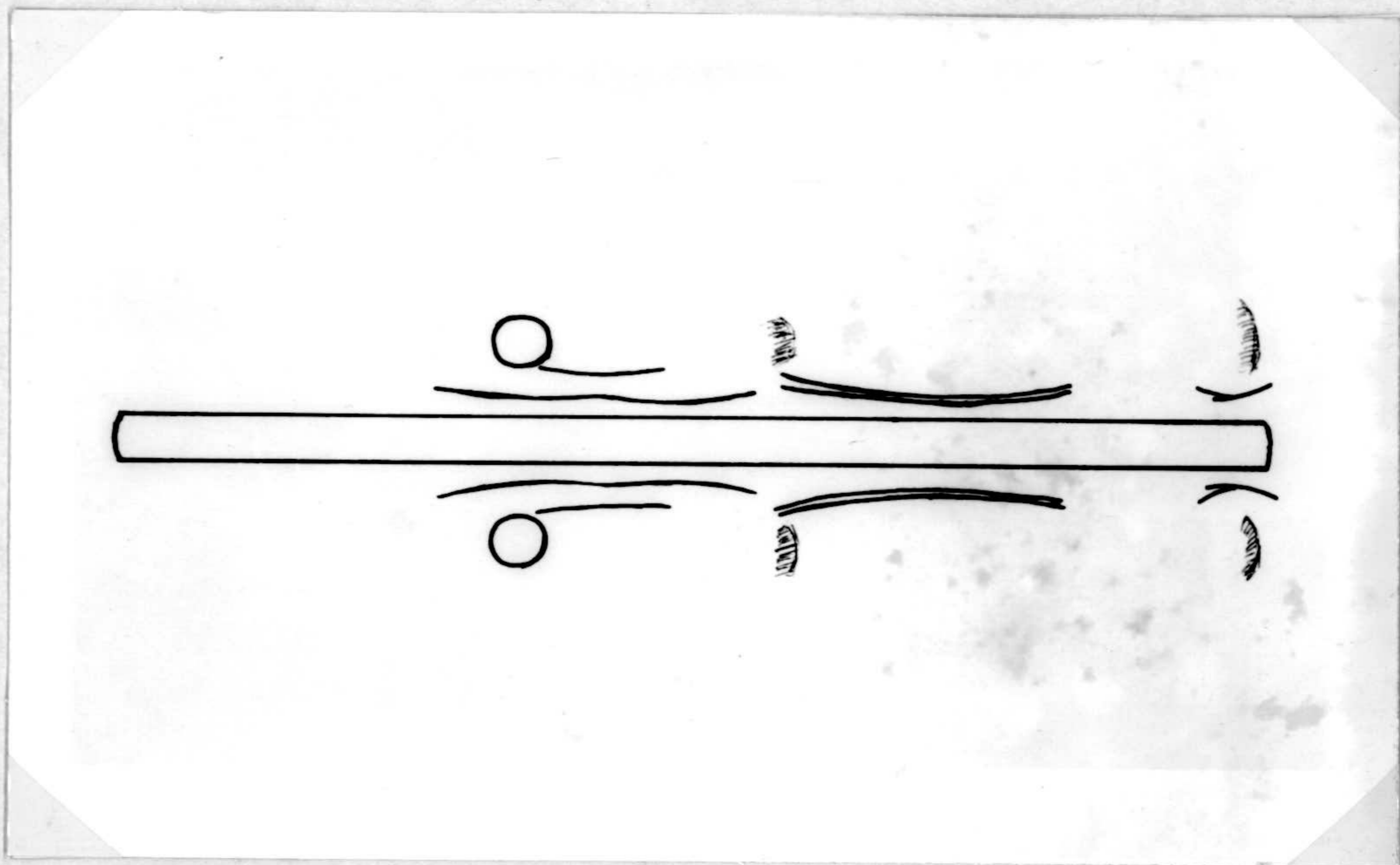


Inmunoelectroforesis paralela de bilis vesicular y suero ovino normal frente a suero anti-bilis absorbido con suero ovino normal

nera: dos en la zona de la albúmina, otros dos en la zona de las alfa y beta globulinas y otros dos en la zona del complejo lipoproteína-pigmento.

En la Lámina VIII, se observa un esquema de esta inmunoelectroforesis.

LAMINA VIII



Inmunoelectroforesis de bilis vesicular frente a suero anti-suero ovino normal

Experiencia nº VII

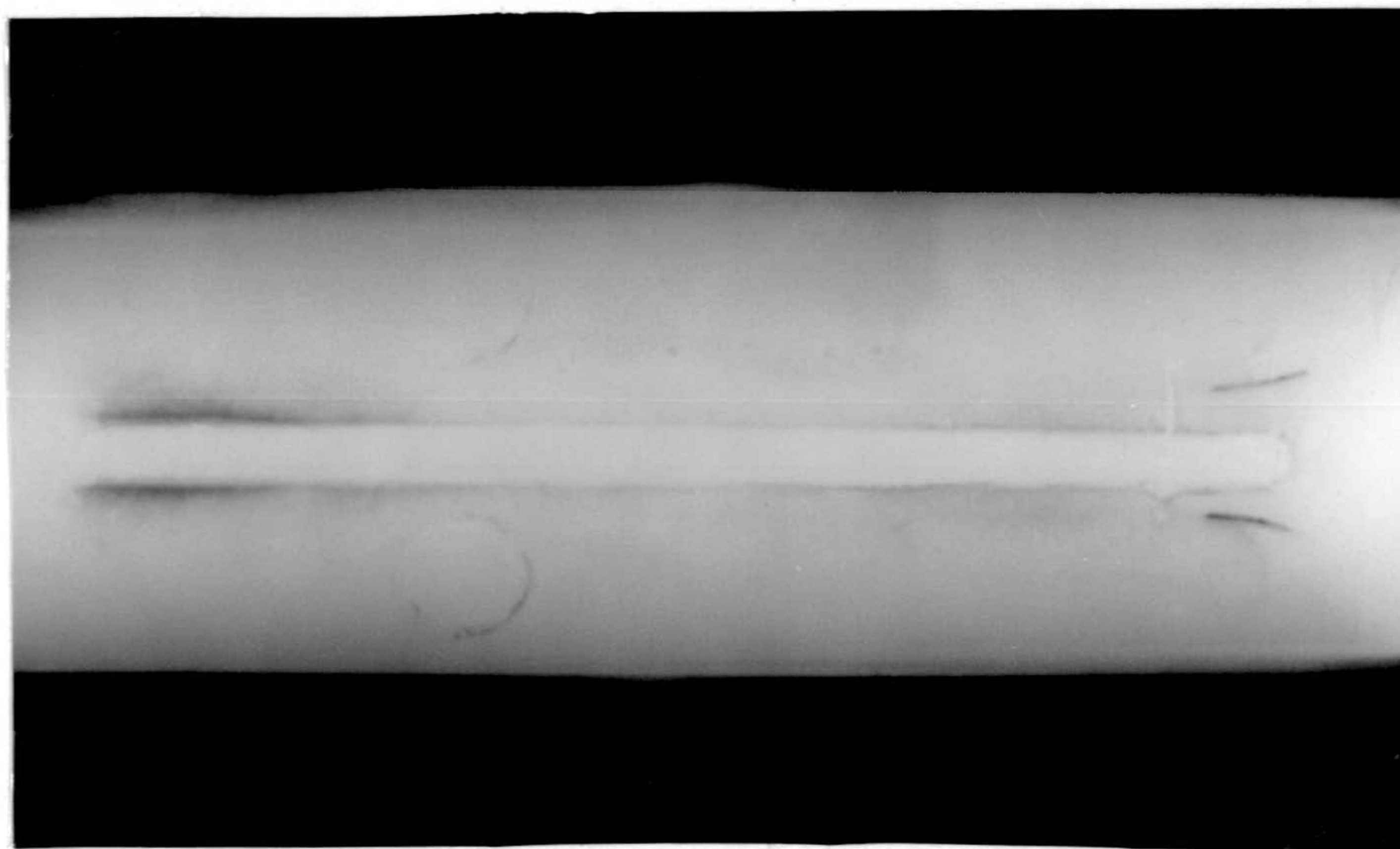
El suero anti-suero ovino normal fue ensayado frente a una mezcla de 30 bilis vesiculares ovinas. El objeto de utilizar esta mezcla fue comprobar si aumentaban el número de arcos de precipitación que habíamos observado en la experiencia anterior. La inmunolectroforesis siguió mostrando los mismos 6 arcos.

Experiencia nº VIII

En la experiencia nº VI, habíamos detectado dos arcos de precipitación en la zona del complejo lipoproteína-pigmento, que correspondían a dos antígenos comunes con proteínas del suero sanguíneo. Para identificar estas proteínas, hicimos inmunolectroforesis de la bilis y suero inmune preparado frente a gamma globulina ovina. En la zona del complejo, obtuvimos un arco de precipitación. Una de las fracciones proteicas ligadas al pigmento es pues una gamma globulina.

La Lámina IX, muestra una fotografía de esta inmunolectroforesis.

LAMINA IX



Inmunoelectroforesis de bilis ovina normal, frente a suero anti-gamma globulina ovina.

Experiencia nº IX

Con el mismo fin que en la experiencia anterior, realizamos inmunolectroforesis de la bilis frente a suero anti-albúmina ovina. El resultado obtenido fue negativo, pues obtuvimos un arco de precipitación en la zona correspondiente a la albúmina sérica.

4.2.- INVESTIGACION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS EN BILIS
DE ANIMALES PARASITADOS POR F. HEPATICA

Experiencia nº I

En esta primera experiencia hemos ensayado 36 bilis de animales parasitados, por inmunodifusión, frente a sus mismos sueros.

Las bilis, dializadas durante 48 horas frente a suero salino, fueron concentradas al 1/4. Los sueros los hemos utilizado sin concentrar, concentrados al 1/2 y al 1/4.

De las 20 bilis de cabra ensayadas, 9 resultaron negativas; 6 revelaron una banda de precipitación; 2, dos bandas; otras 2, tres bandas y 1, cuatro bandas.

Las Láminas X y XI, muestran fotografías de los resultados de estas inmunodifusiones.

Un total de 8 bilis ovinas, de las 16 ensayadas fueron positivas, revelando 5, una banda y 3, tres bandas

de precipitación.

Los resultados de esta experiencia nos indican que en la bilis existen antígenos capaces de reaccionar con los sueros de animales espontáneamente infestados por Fasciola hepática.

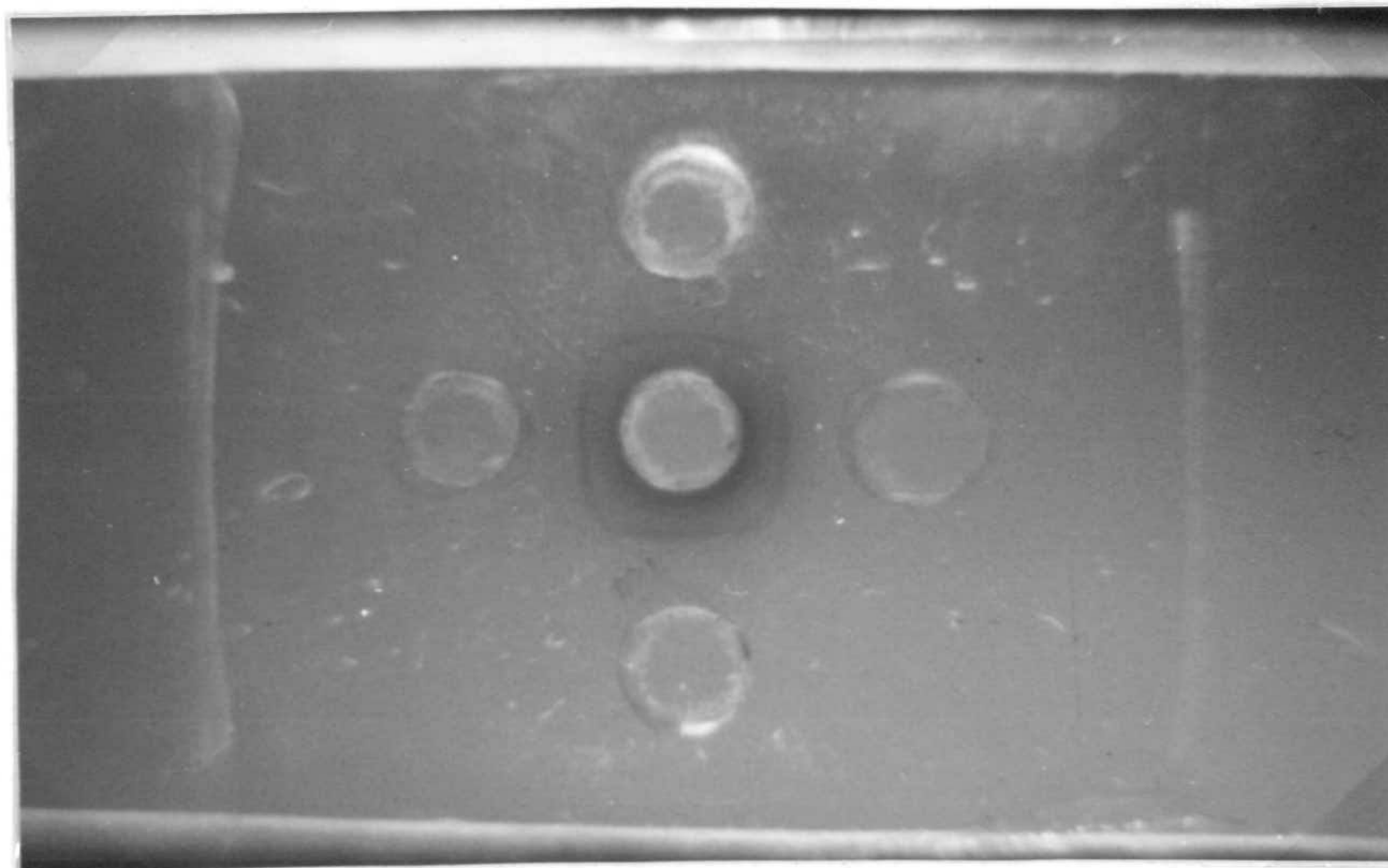
Experiencia nº II

Esta experiencia fue realizada paralelamente a la anterior y nos sirvió de control. En ella, hemos realizado inmunodifusión de 21 bilis de choto y de borrego, de 10 a 15 días de edad, que no estaban parasitadas por Fasciola, frente a sus respectivos sueros. Tanto los sueros como las bilis fueron utilizados en las mismas condiciones de la experiencia anterior.

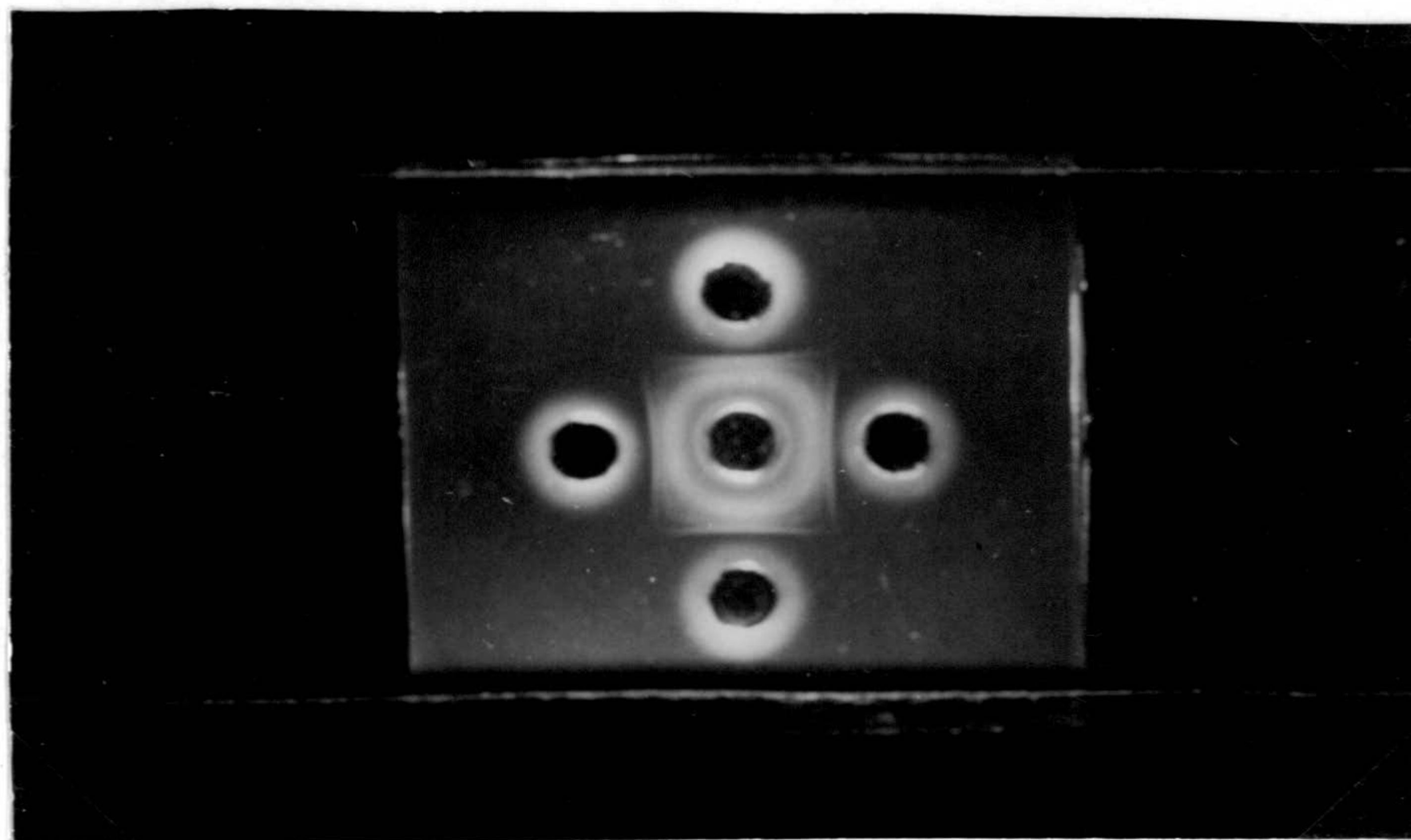
Los resultados obtenidos fueron en su totalidad negativos. En la bilis de animales sin parasitar, no existen antígenos capaces de reaccionar con el suero de los mismos.

Los arcos de precipitación obtenidos en la expe-

LAMINA X

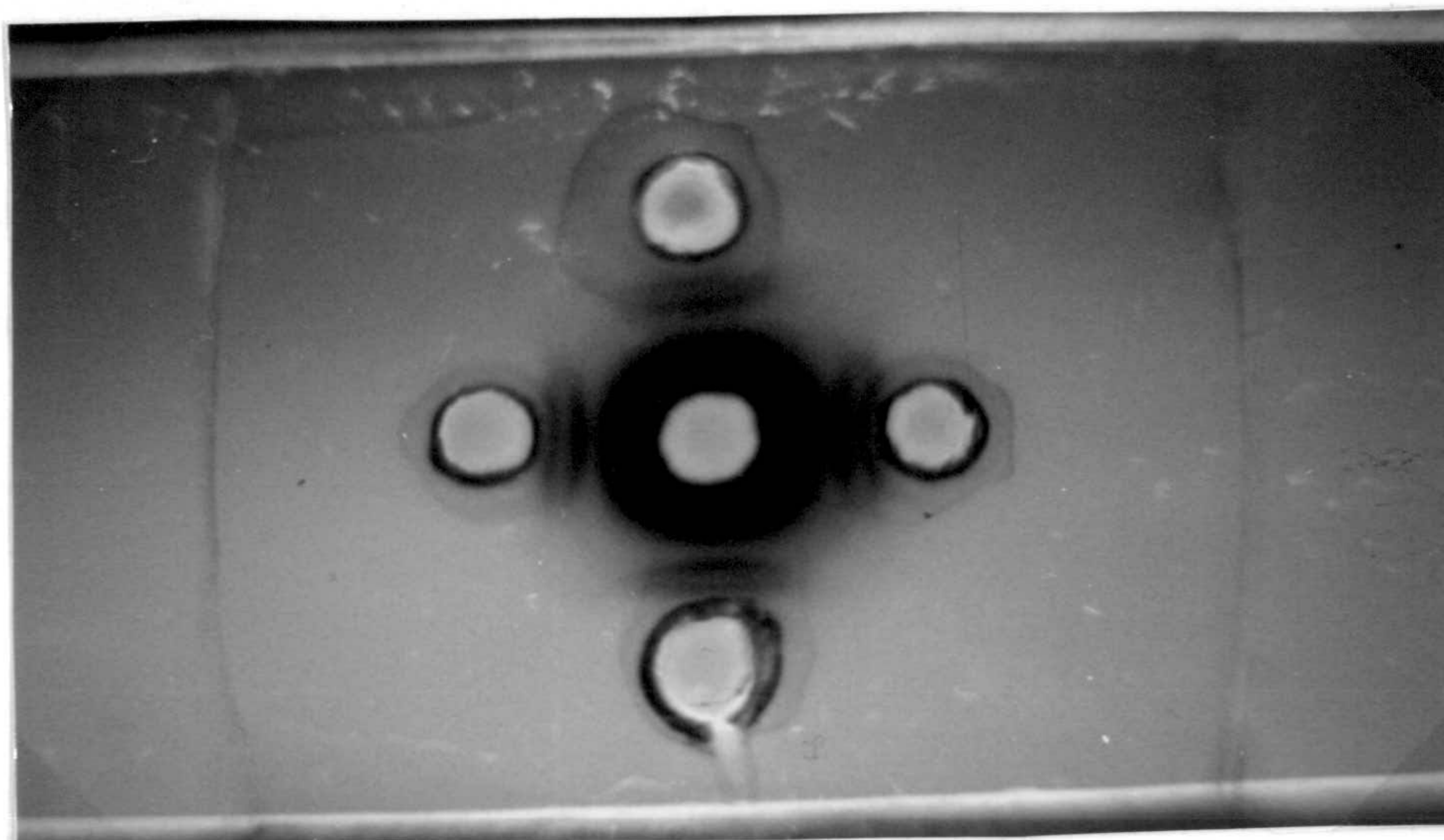


Inmunodifusión de una de las bilis de cabra parasitada, frente a su mismo suero, donde se observa una banda de precipitación.

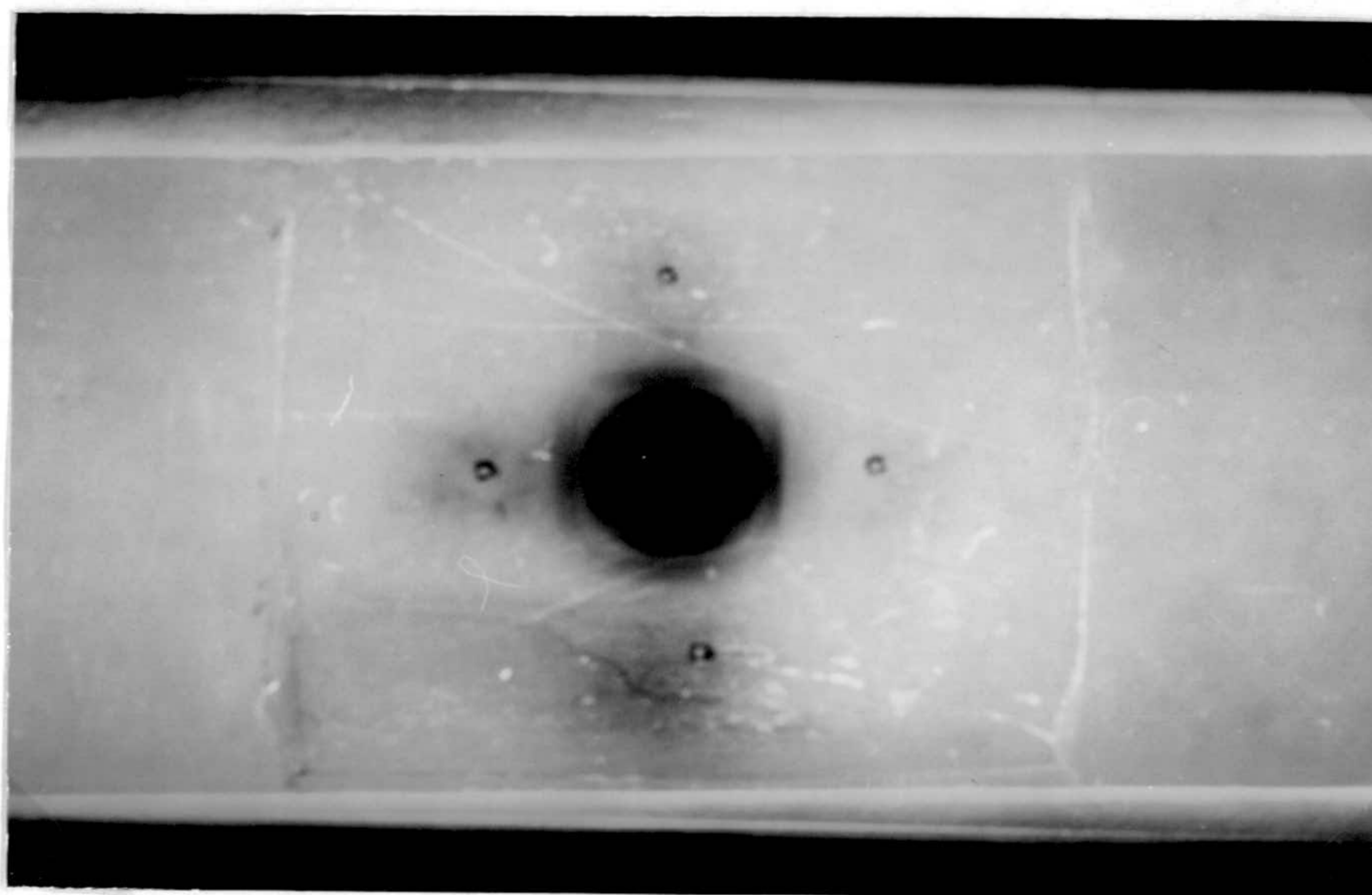


Inmunodifusión de una de las bilis de cabra parasitada, frente a su mismo suero, donde se observan dos bandas de precipitación.

LAMINA XI



Inmunodifusión de una de las bilis de cabra parasitada, frente a su mismo suero, donde se observan tres bandas de precipitación.



Inmunodifusión de una bilis de cabra parasitada, frente a su mismo suero, donde se observan cuatro bandas de precipitación.

riencia anterior se deben pues a verdaderas reacciones antígeno-anticuerpo.

Experiencia nº III

Ha tenido por objeto la localización, por inmunoelectroforesis, de las bandas de precipitación observadas en la primera experiencia.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Bilis caprinas

Seis, mostraron un arco de precipitación, localizado en la zona del complejo lipoproteína-pigmento.

Una, dos arcos, con la misma localización anterior.

Una, cuatro arcos, dos localizados en la zona de la albúmina y dos en la zona del complejo.

Una, seis arcos, dos situados en la zona de la albúmina, dos en la zona de las alfa globulinas y dos también en la zona del complejo.

Una, ocho arcos, dos localizados en la zona de la albúmina, tres en la de las alfa globulinas, uno entre las alfa globulinas y la albúmina y dos al igual que en todas las anteriores, localizados en la zona del complejo. (Lámina XII).

Una, negativa.

Bilis ovinas

De las ocho bilis de oveja, solamente tres dieron reacción positiva por inmunoelectroforesis, dos de ellas revelaron un arco al final del canal y una, dos arcos también localizados al final del canal.

Existen al menos en la bilis de caprinos parasitados por F. hepática, 8 antígenos revelables por el suero de estos mismos animales.

En las bilis ovinas se revelan exclusivamente dos arcos de precipitación.

Los dos arcos localizados en la zona del complejo lipoproteína-pigmento revelados tanto en las bilis caprinas como en las ovinas, se corresponden con otros tantos antígenos presentes en la bilis que, además según pudimos comprobar en la experiencia nº VI del apartado anterior son comunes con el suero. En los sueros de animales parasitados existen pues anticuerpos dirigidos frente a dos componentes biliares, ligados al pigmento que migra

LAMINA XII

Esquema de inmunolectroforesis de bilis de
cabra parasitada frente a su mismo suero.

más rápidamente en la electroforesis.

Los otros arcos detectados, deben corresponder a antígenos propios de Fasciola hepática.

Experiencia nº IV

Para tratar de identificar los antígenos de Fasciola que se encuentran presentes en la bilis, ensayamos por inmunolectroforesis las mismas bilis de la experiencia anterior con un suero anti-extracto total de Fasciola.

Solamente 6 bilis caprinas resultaron positivas mostrando 4, un arco de precipitación, en tres de ellas el arco aparece en la zona del pigmento final y en una entre las alfa y beta globulinas; 1, dos arcos, uno al final del canal y otro entre los dos pigmentos y 1, cinco arcos, dos en la zona del complejo lipoproteína-pigmento y tres localizados entre los dos pigmentos.

De las 3 bilis de oveja, 1, fue negativa; 1, reveló dos arcos, uno al final del canal y otro grande en la zona de las alfa y beta globulinas del suero; la otra

muestra reveló tres arcos, dos localizados en la zona comprendida entre los dos pigmentos y otro al final del canal.

En las bilis de cabras parasitadas, hemos detectado pues hasta 6 arcos de precipitación distintos al ser ensayadas con el suero anti-extracto total de Fasciola. Cinco se corresponden con otros tantos de los observados en la tercera experiencia y uno no tiene correspondencia.

La Lámina XIII, representa un esquema de los arcos de precipitación totales, obtenidos por inmunoelectroforesis de las bilis de cabra parasitadas y el suero anti-extracto total de Fasciola.

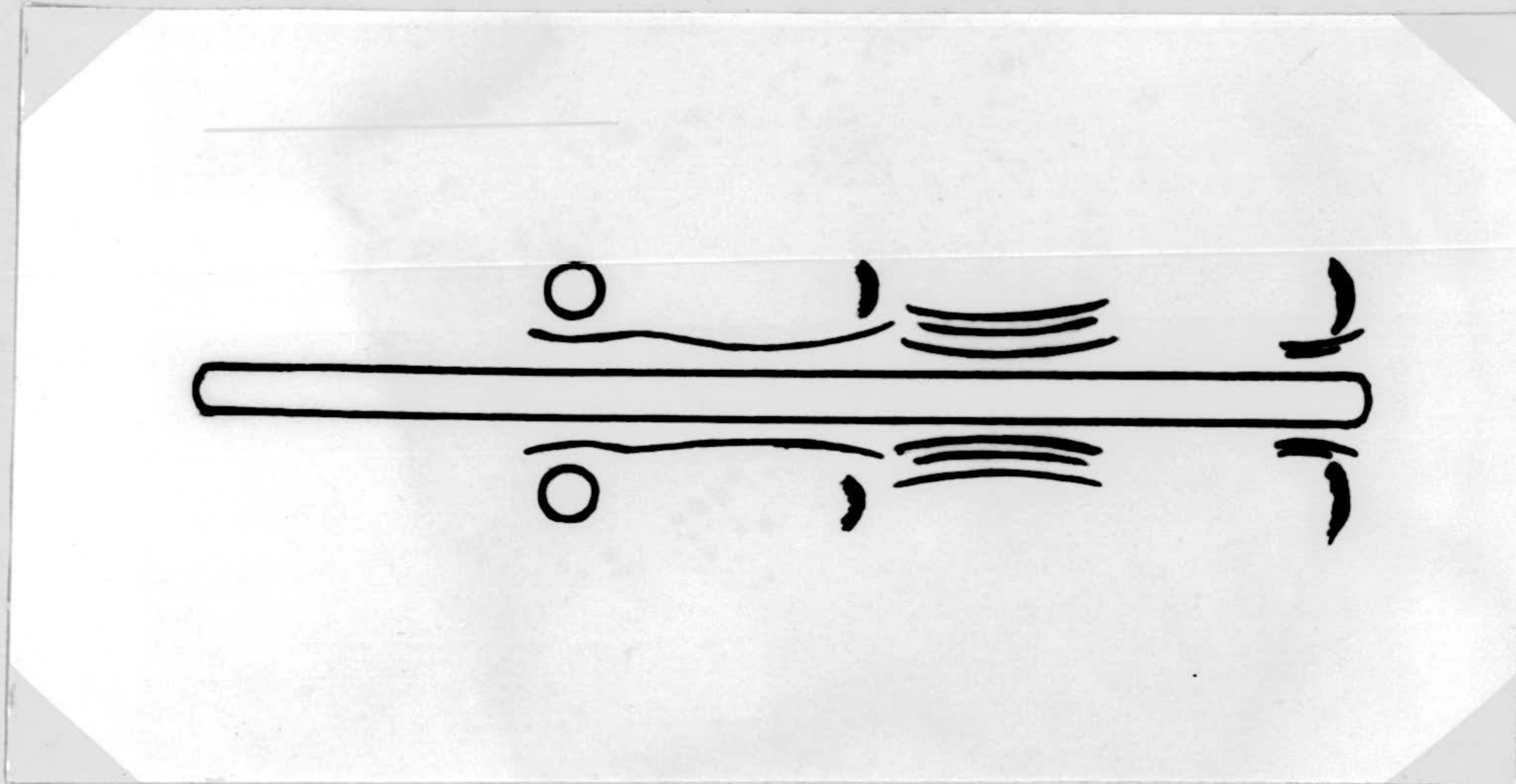
En las bilis ovinas, se han revelado un máximo de 4 arcos de precipitación.

La Lámina XIV, muestra un esquema de los arcos de precipitación obtenidos con estas bilis.

Experiencia nº V

En esta experiencia, se hizo inmunoelectrofore-

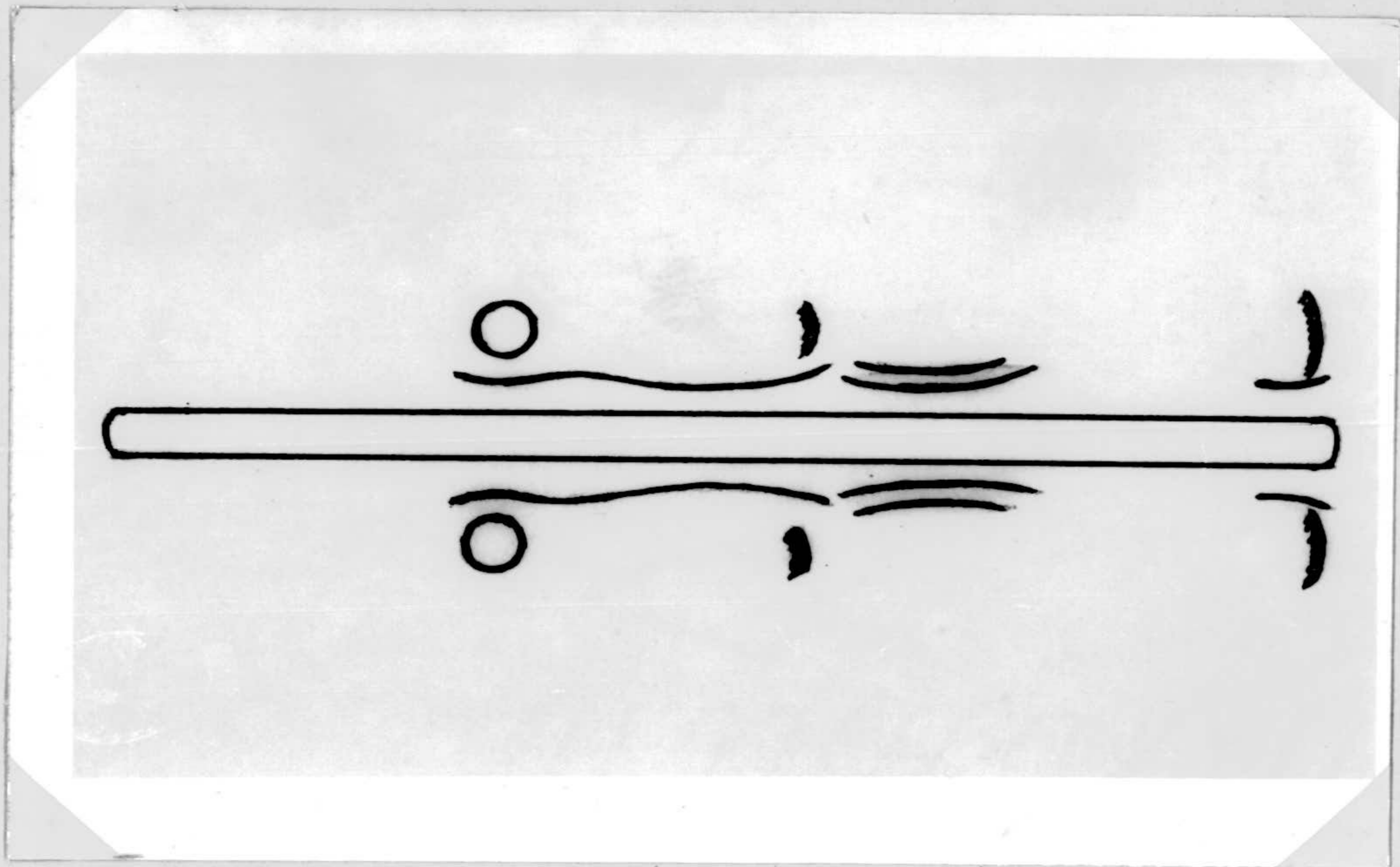
LAMINA XIII



Esquema que representa los arcos totales obtenidos por inmunolectroforesis de las bilis de cabra parasitadas y el suero anti-extracto total de Fasciola.

BIBLIOTECA
UNIVERSITARIA
GRANADA

LAMINA XIV



Esquema que representa los arcos totales obtenidos por inmunolectroforesis de las bilis ovinas parasitadas y el suero anti-extracto total de Fasciola.

sis de una mezcla de las bilis de cabras de las experiencias anteriores frente al suero anti-extracto total de Fasciola y también de una mezcla de las de oveja, al objeto de comprobar si los antígenos no identificados en la experiencia anterior estaban en baja proporción y de esta forma se revelaban.

No fue revelado ningún nuevo antígeno. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la experiencia anterior.

Experiencia nº VI

En la experiencia nº III, al ensayar bilis de animales parasitados con sus sueros homólogos, habíamos detectado la presencia de anticuerpos frente a dos antígenos biliares con localización en la zona del complejo lipoproteína-pigmento.

En esta experiencia hemos ensayado 14 bilis de borrego y 21 de choto sin parasitar, con sueros de animales homólogos parasitados.

La inmunodifusión se mostró positiva en las 14 bilis de borrego y en 19 de choto. Por inmunoelectroforesis se detectaron los dos arcos de precipitación en el final del canal, zona del complejo lipoproteína-pigmento.

Estos resultados nos confirman que los antígenos frente a los cuales los animales parasitados elaboran estos anticuerpos, son componentes normales de la bilis, presentes tanto en las de animales parasitados como no parasitados.

Experiencia nº VII

En esta experiencia hemos realizado inmunodifusión de sueros de animales con fasciolosis frente a bilis normales y también parasitadas. Con ello, hemos querido confirmar la identidad de los antígenos presentes en ambas bilis.

Hemos utilizado los mismos sueros y bilis de la experiencia nº III y de la anterior. La inmunodifusión de todos ellos ha revelado identidad total en dos de las bandas obtenidas.

Estos resultados confirman los de la experiencia anterior.

La Lámina nº XV A,B, muestra dos esquemas que representan esta reacción de identidad.

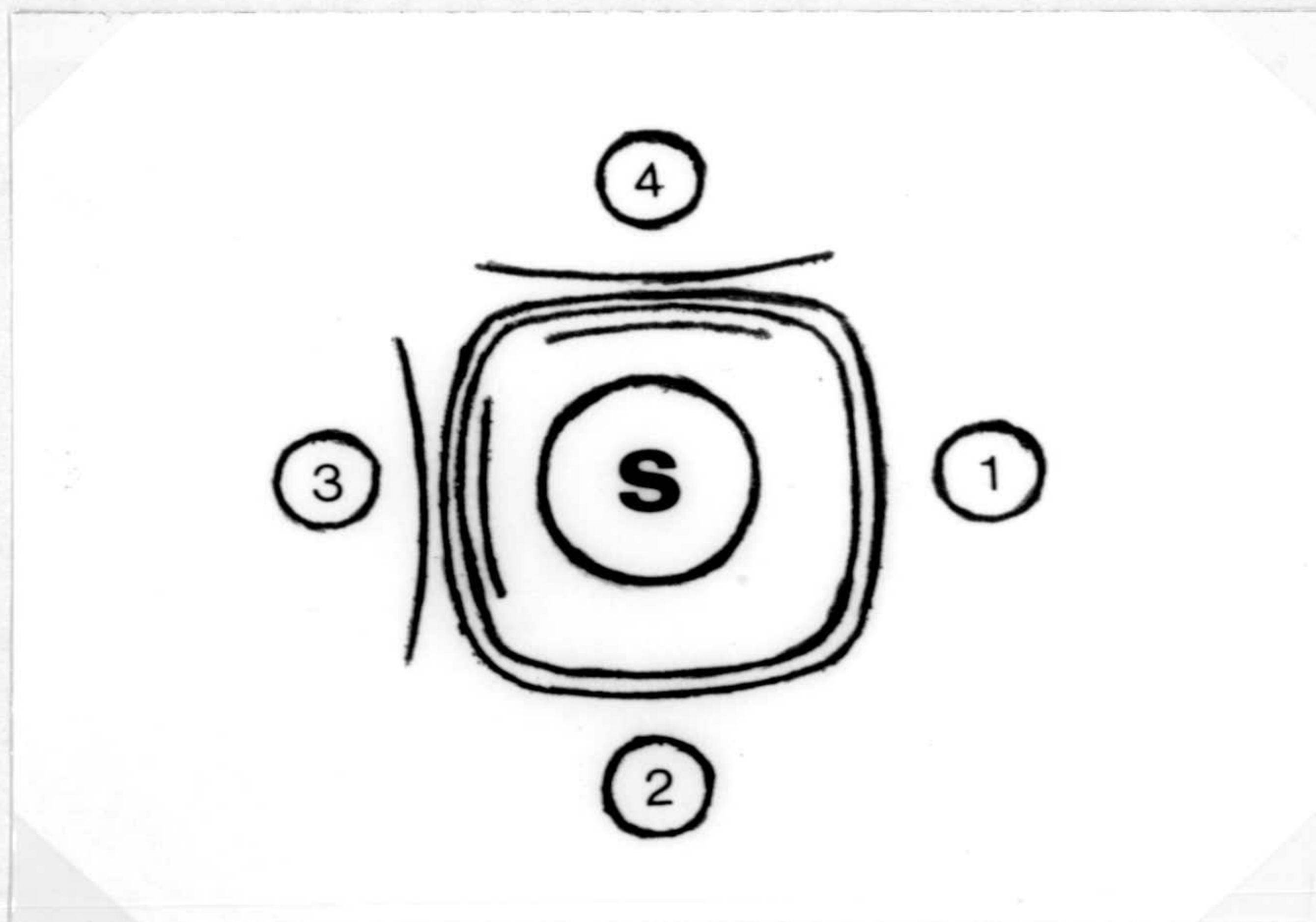
Experiencia nº VIII

La finalidad de esta experiencia ha sido comprobar si sueros humanos portadores de fasciolosis mostraban reacción positiva al ser ensayados frente a bilis de animales parasitados.

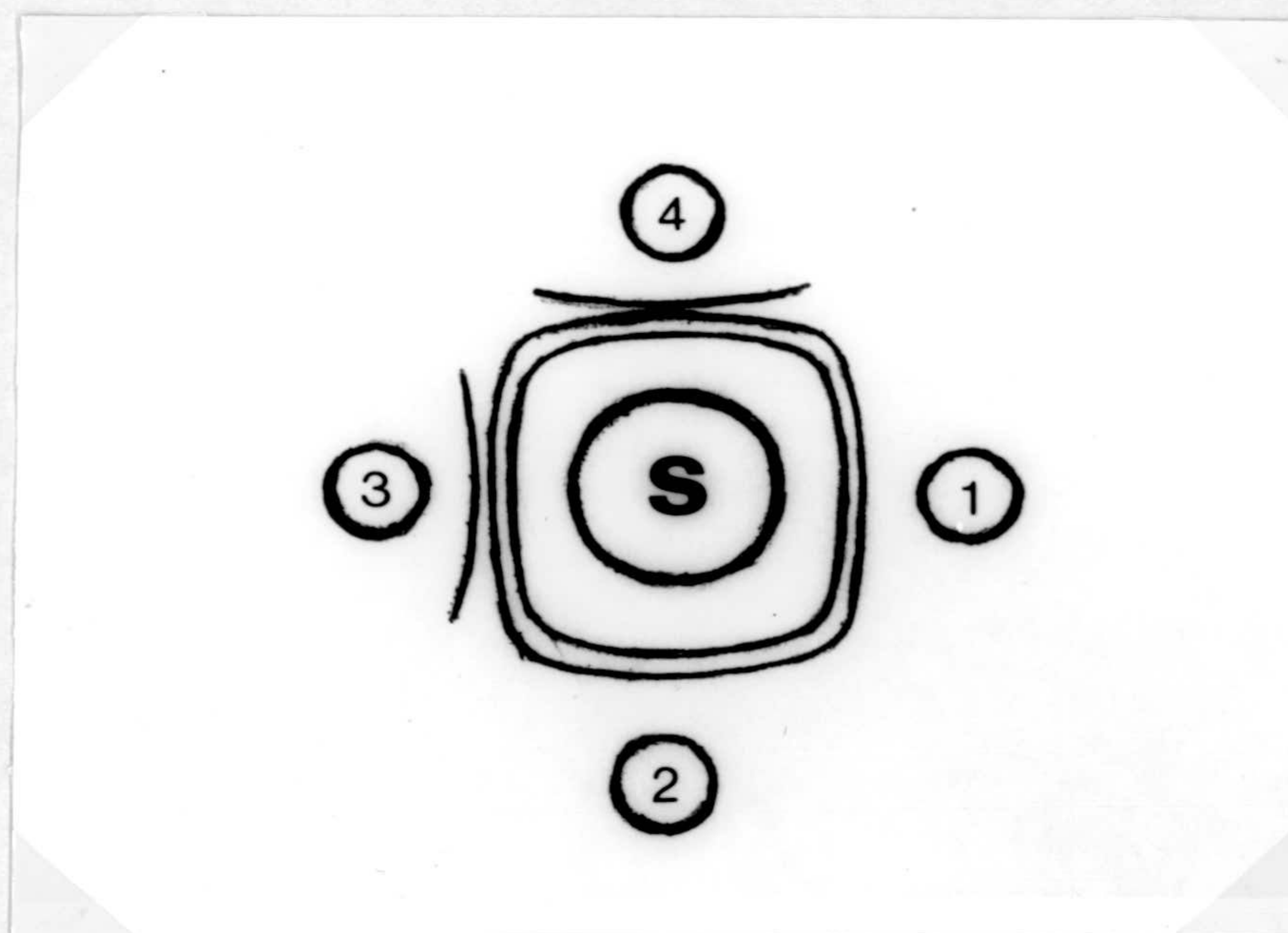
Utilizamos 4 sueros de individuos con fasciolosis confirmada por coproscopia.

Los sueros fueron ensayados por inmunodifusión frente a tres bilis en las cuales habíamos detectado con anterioridad la presencia de tres antígenos al ser ensayadas con sus respectivos sueros. Tres de estos dieron reacción positiva, revelandose en ellos un máximo de dos bandas de precipitación, el otro suero resultó negativo.

LAMINA XV



A.- 1, 2 = Bilis de cabra sin parasitar
3, 4 = Bilis de cabra parasitada
S = Suero de cabra parasitada



B.- 1, 2 = Bilis de oveja sin parasitar
3, 4 = Bilis de oveja parasitada
S = Suero de oveja parasitada

La localización por inmunolectroforesis de estas bandas de precipitación, no nos fue posible pues con estos ensayos se agotaron los sueros.

Experiencia nº IX

En la experiencia nº IV, habíamos detectado por inmunolectroforesis los dos antígenos de la bilis que se localizan en la zona del complejo cuando esta era ensayada frente a un inmunisero de Fasciola hepática. Este hecho y el haberlos detectado también con sueros de animales espontáneamente infestados nos llevó a pensar que los anticuerpos formados en la fasciolosis animal frente a estos antígenos biliares, se deben a la presencia de antígenos comunes a Fasciola y la bilis.

En esta experiencia, hemos realizado inmunodifusión de sueros de ovejas y cabras parasitadas frente a bilis normal y extracto de Fasciola, al objeto de comprobar si existía identidad en alguna de las bandas.

La Lámina nº XVI, muestra un esquema de una de las reacciones de identidad obtenidas al ensayar sueros

ovinos.

Como puede observarse aparece una banda común entre el extracto y la bilis respectivamente. Este mismo resultado fue obtenido cuando se utilizaron sueros caprinos.

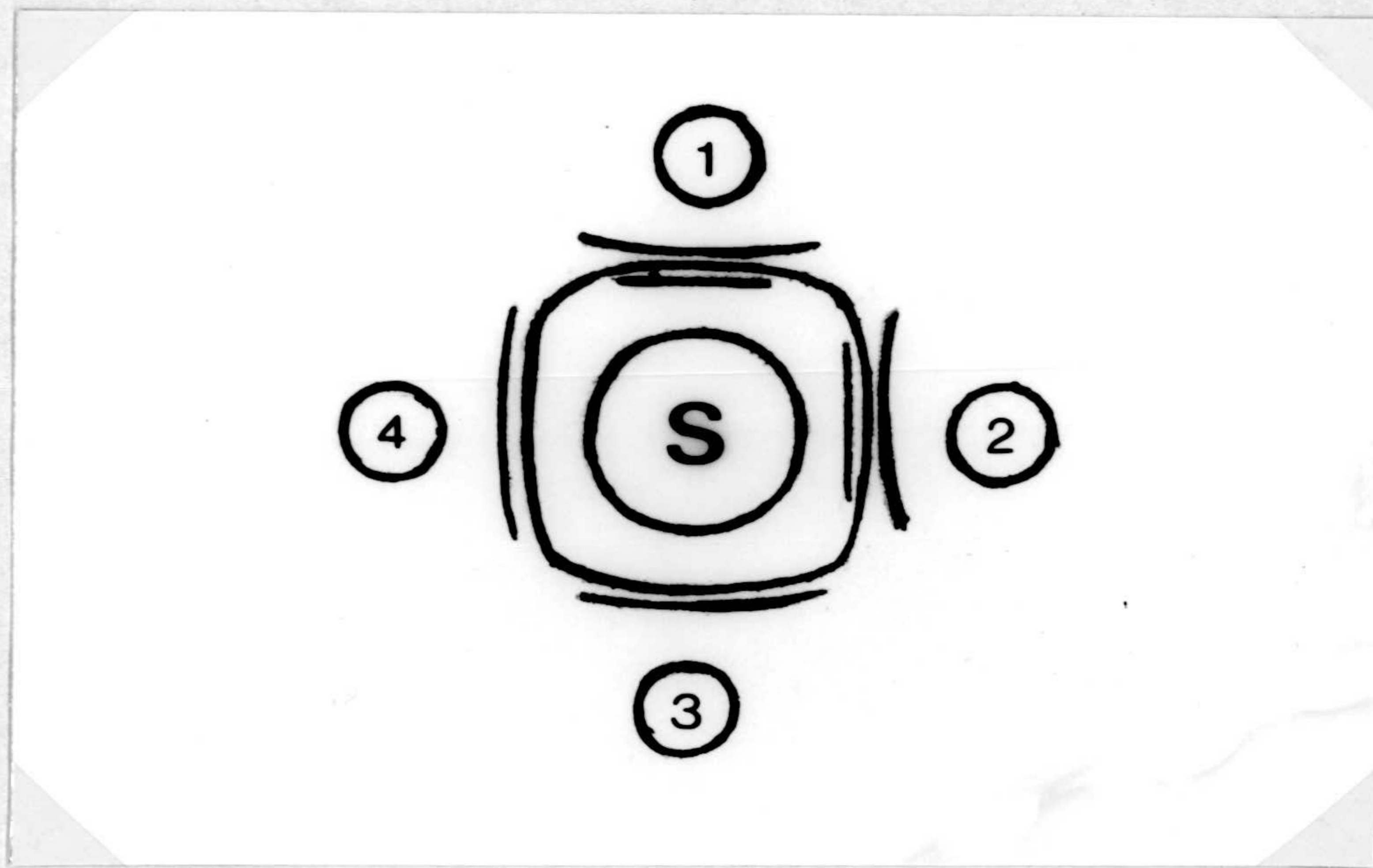
Experiencia nº X

En experiencias anteriores habíamos comprobado que el suero de animales espontáneamente infestados posee anticuerpos dirigidos frente a dos componentes biliares localizados en la zona del complejo.

Esta nueva experiencia la realizamos al objeto de demostrar la posible existencia de estos mismos anticuerpos en la bilis de animales parasitados.

En ella, hemos ensayado por inmunodifusión 14 bilis de oveja y 14 de cabra con fasciolosis frente a otras tantas bilis de animales sin parasitar. En cinco del total de bilis ovinas ensayadas fueron reveladas dos bandas de precipitación. Igualmente se revelaron dos bandas en

LAMINA XVI



1,2 = Extracto total de Fasciola hepática
3,4 = Bilis de oveja sin parasitar
S = Suero de oveja parasitada

cuatro de las bilis caprinas.

Por inmunolectroforesis no pudimos localizar los antígenos, pues la difusión de la bilis colocada en el canal, da lugar a un intenso color verde que enmascara los posibles arcos de precipitación.

Experiencia nº XI

Esta experiencia fue una confirmación de la anterior. Puesto que los antígenos presentes en la bilis, que dan lugar a la formación de anticuerpos, son comunes al suero, ensayamos las mismas bilis anteriores parasitadas, con sueros de borrego y de choto sin fasciolosis.

Los resultados obtenidos por inmunodifusión con las bilis caprinas y ovinas, fueron similares a las de la experiencia anterior. La inmunolectroforesis, dió una sola banda al final del canal.

Experiencia nº XII

Fue montada al objeto de comprobar si en la fas-

ciolosis animal, aparte de existir anticuerpos frente a dos componentes de la bilis, existen también anticuerpos frente al tejido hepático.

Se prepararon extractos de hígado de choto y de borrego, libres de parasitismo, con una concentración en proteínas de 1,13 g% y 1,78 g% respectivamente y se ensayaron por inmunodifusión frente a 20 sueros de animales naturalmente infestados. Estos sueros fueron utilizados sin concentrar y concentrados al 1/2 y 1/4. Los extractos también fueron utilizados diluidos al 1/2, sin concentrar, concentrados al 1/2 y 1/4.

En ningún caso hemos obtenido bandas de precipitación.

Este resultado no nos permite negar la existencia de anticuerpos anti-tejido hepático. Es posible que de existir, se encuentren en tan baja concentración que no sean detectados por esta técnica.

Experiencia nº XIII

La realización de esta experiencia ha tenido por objeto comprobar si en la bilis de los animales parasitados, aparte de los anticuerpos que reaccionan frente a dos componentes biliares, uno de los cuales es común con Fasciola, existen también anticuerpos frente a componentes específicos del parásito.

Hemos realizado precipitación, con sulfato amónico a media saturación, de las gamma globulinas de una mezcla de 10 bilis de cabra por una parte y de 10 bilis de ovejas por otra, en las cuales habíamos comprobado la existencia de fasciolosis. Después de obtenidas, las gamma globulinas fueron concentradas cinco veces por pase a través de membranas AMICON-S125.

Los ensayos realizados, con un extracto de Fasciola de una concentración proteica de 0,97 g%, no han revelado anticuerpos frente a antígenos exclusivos de Fasciola.

Experiencia nº XIV

Esta experiencia fue repetición de la anterior. Se precipitaron de nuevo las gamma globulinas de las bilis y se ensayaron frente a un nuevo extracto cuya concentración proteica fue mayor que la utilizada en la experiencia anterior (2,4 g%).

Los resultados obtenidos fueron similares. Lo que nos permite afirmar que, en nuestras condiciones experimentales, en la bilis de animales parasitados no hemos detectado anticuerpos frente a antígenos propios de Fasciola.

5.- D I S C U S I O N

El estudio inmunológico de la bilis vesicular de animales parasitados no se había realizado hasta ahora, que nosotros sepamos. Dada la localización hepática de algunos parásitos: Dicrocoelium, Fasciola, Capillaria, Amoeba, Toxoplasma etc... pensamos que este estudio es de sumo interés ya que puede servir de base para el conocimiento de las relaciones huésped-parásito, consideradas éstas bajo el aspecto inmunológico.

En la primera parte de este trabajo de Tesis Doctoral, abordamos el estudio electroforético e inmunoelectroforético de la bilis vesicular ovina normal, como paso previo para el posterior de la de animales parasitados.

Por electroforesis, hemos detectado un total de cinco componentes proteicos y uno lipídico. Una de las fracciones proteicas tiene forma de arco y se encuentra ligada a la bilirrubina. De todas las fracciones proteicas es la que migra más rápidamente, encontrándose localizada en una zona bastante más alejada que la seroalbúmina.

La siguiente fracción se encuentra en la zona de la seroalbúmina. Continua una fracción alargada y poco diferenciada, localizada en la zona de las alfa y beta globulinas séricas y otra con localización en la de las gamma globulinas. La última fracción proteica tiene una clara migración catódica y parece no asemejarse por su localización a ninguna de las proteínas del suero.

La fracción lipídica al igual que la primera fracción proteica se encuentra en la zona de la bilirrubina, ligada a ella y formando un complejo macromolecular lipoproteína-pigmento.

Aparte del pigmento ligado a la fracción proteica y lipídica, hemos detectado otro localizado en la zona de las alfa globulinas séricas, que según Verschure, 1956 (114), se corresponde con otro tipo de bilirrubina.

Este mismo autor, (114), empleando la electroforesis en papel y utilizando bilis vesicular humana, encuentra cuatro fracciones proteicas que designa con las letras P_1 , P_2 , P_3 y P_4 . La fracción P_1 se corresponde con el complejo lipoproteína-pigmento y las P_2 , P_3 y P_4 con las lo-

calizadas por nosotros en la zona de la albúmina, alfa y beta globulinas y gamma globulinas respectivamente. Este autor, no encuentra la fracción con localización catódica que nosotros hemos detectado, debido al escaso poder resolutivo del papel utilizado como soporte de la electroforesis. Por el contrario, Rawson, 1962 (115), utilizando un gel de agar, encuentra en la bilis humana las mismas cinco fracciones detectadas por nosotros.

El complejo lipoproteína-pigmento presente en la bilis humana ha sido estudiado por Verschure y col., 1956 (116). Según estos autores, el peso molecular del complejo es de 26.000, no tiene composición química constante, contiene el total de la bilirrubina y sugieren que la lipoproteína es producida dentro de la vesícula biliar. Contiene este pigmento la mayor parte del colesterol, sales y ácidos biliares.

En un trabajo posterior, Verschure y col., 1956 (117), sintetizan un complejo similar al encontrado en la bilis y hacen un estudio comparativo de ambos, tratando de dilucidar por electroforesis y tinción específica la presencia de proteínas en ellos. El complejo natural se

tiñe bien con azocarmín. En el complejo sintético ensayan si tiene capacidad de ligar proteínas del suero: albúmina, gamma globulinas y otras. Mostraron que este complejo liga pequeñas cantidades de albúmina y gamma globulina.

En este estudio, llegan a la conclusión de que el complejo se forma en la vesícula biliar, donde las condiciones químicas y físico-químicas son óptimas.

El estudio analítico realizado por nosotros nos muestra una similitud de componentes con la bilis humana.

Por inmunolectroforesis de bilis ovina y un suero anti-bilis ovina normal, hemos detectado un total de 14 arcos de precipitación que se corresponden con otras tantas fracciones antigénicas presentes en la bilis.

Los dos arcos localizados en la zona del complejo, no se revelan de una manera regular, en ocasiones, aparecen los dos otras solo uno y a veces ninguno, lo que se puede explicar por una concentración no constante de los componentes ligados.

Al objeto de determinar cuales de estas fracciones eran específicas de la bilis, el inmunisero preparado frente a bilis se absorbió con suero ovino normal en exceso. La inmunolectroforesis paralela de bilis y suero normal, con este inmunisero absorbido, reveló 8 arcos de precipitación que, con respecto a la electroforesis simple de bilis estuvieron localizados: tres en la zona de la albúmina, otros tres en la de las alfa y beta globulinas y dos en la zona de las gamma globulinas.

Para investigar los antígenos biliares comunes con los del suero sanguíneo, realizamos inmunolectroforesis de la bilis frente a un suero inmune preparado en conejo por inyección de suero ovino normal. El número máximo de arcos de precipitación obtenido fue de 6. Estos estuvieron localizados: dos en la zona de la albúmina, dos en la de las alfa y beta globulinas y otros dos en la zona del complejo lipoproteína-pigmento.

Chisiu, 1965 (118), trabajando con bilis vesicular humana encuentra 18 fracciones antigénicas, de ellas, 8 son propias de la bilis y 10 comunes con el suero. Nuestros resultados concuerdan con los de este autor en el nú-

mero de antígenos específicos de la bilis, pero no con la localización de dos de ellos. En nuestros ensayos los dos antígenos que detectamos en la zona del complejo lipoproteína-pigmento, no son propios de la bilis, sino que se corresponden con dos proteínas presentes en el suero sanguíneo. Estos resultados son concluyentes, ya que un suero anti-suero ovino normal los detecta en la bilis. En principio, podría pensarse que las proteínas ligadas al pigmento de la bilis humana fueran verdaderamente específicas, no obstante, como veremos posteriormente, al igual que en la bilis ovina, estas proteínas son del suero.

El lugar de formación de los componentes propios de la bilis, ha sido determinado por Chisiu, 1965 (118). Por inmunofluorescencia este autor ha comprobado que se sintetizan en las células parietales de los canalículos biliares. En su opinión, intervienen las células hepáticas y las de Kupfer. Por este motivo, considera que los conductos biliares funcionan como verdaderas glándulas de secreción.

Con respecto a los componentes antigénicos comunes con el suero, nosotros hemos encontrado un número me-

nor, 4 fracciones menos, ésto quizás pueda deberse a que estas fracciones en la bilis ovina estén a una concentración más baja y no sean revelables, o bien a que verdaderamente no existen estas fracciones.

Actualmente se piensa que el paso de sustancias del suero a la bilis tiene lugar por vía sinusoidal capilar y en él no intervienen las células hepáticas. En condiciones patológicas el paso de sustancias de la bilis al suero también se da, tal es el caso de la presencia de pigmentos biliares en el suero, en el caso de las hepatitis.

Puesto que habíamos comprobado que los dos antígenos localizados en la zona del complejo lipoproteína-pigmento eran comunes con el suero, intentamos identificar por inmunoelectroforesis que proteínas eran éstas. Utilizamos en un ensayo bilis ovina y un suero anti-gamma globulinas ovinas y en otro un suero anti-albúmina ovina. Solo obtuvimos reacción al ensayar el primer inmunisero, observandose un arco de precipitación. Uno de los componentes localizado en la zona del pigmento es pues una gamma globulina procedente del suero. Este resultado está de

acuerdo con el trabajo de Verschure y col., 1956 (117), quien utilizando un complejo sintético similar al existente en la bilis humana, a base de lecitinas, colesterol y ácidos biliares, observa que es capaz de ligar gamma globulinas del suero humano. Este autor encuentra que el complejo es capaz también de ligar albúmina. Nosotros no la hemos detectado. Como hemos señalado anteriormente estos dos arcos no se revelan de una manera constante. En las muestras ensayadas es posible que exista albúmina en pequeña cantidad y por esto no se revela.

Los resultados obtenidos por Verschure y col., 1956 (117), y los nuestros, confirman que los antígenos que dan lugar a estos dos arcos de precipitación son proteínas del suero. El hecho de que Chisiu, 1965 (118), no los detecte en la bilis humana como del suero, con gran seguridad puede deberse a que en las bilis utilizadas por él, este componente o componentes no estuvieran en cantidad suficiente para ser revelados.

En la segunda parte de este trabajo hemos estudiado por inmunodifusión e inmunolectroforesis, la bilis de ovejas y cabras parasitadas por Fasciola hepática, tra-

tando de demostrar la existencia de antígenos y anticuerpos en este líquido humoral.

En una primera experiencia realizamos inmunodifusión de bilis con sus respectivos sueros, revelándose un máximo de 4 bandas de precipitación en las bilis caprinas y 3 en las ovinas. Existen por tanto en la bilis de animales parasitados componentes antigénicos revelables por los sueros de estos mismos animales.

Una experiencia control de bilis de animales libres del parasitismo, con sus sueros, dio resultados totalmente negativos, lo que nos confirma que las bandas de precipitación obtenidas se deben a verdaderas reacciones antígeno-anticuerpo.

Las inmunolectroforesis de las bilis y sueros caprinos que por inmunodifusión habían resultado positivas, revelaron un máximo de 8 arcos de precipitación. Como puede observarse en la Lámina nº XII, de estos 8 arcos, dos estuvieron localizados en la zona del complejo lipoproteína-pigmento. Estos dos arcos, como habíamos comprobado en los ensayos realizados en una de las experiencias

del primer apartado, se corresponden a otros tantos antígenos presentes en la bilis y son comunes con dos proteínas del suero, siendo una de ellas una gamma globulina.

Los otros seis componentes antigénicos revelados deben corresponder a antígenos propios de Fasciola. Estos antígenos detectados en la bilis, son productos de secreción y excreción de los parásitos que son vertidos en este líquido procedentes del metabolismo. Son los llamados antígenos metabólicos.

Por lo que respecta a las bilis ovinas, la inmunoelectroforesis reveló solamente los dos arcos de precipitación localizados en la zona del complejo.

Para tratar de identificar estas sustancias antigénicas, realizamos inmunoelectroforesis de las bilis frente a un suero anti extracto total de Fasciola. El total de arcos revelados con el inmunisuero y las bilis caprinas fue de seis, cinco de ellos se corresponden con otros tantos de los observados en la inmunoelectroforesis de bilis positivas con sus respectivos sueros y uno no se corresponde (Lámina nº XIII). Como puede observarse dos

de estos cinco antígenos están localizados también en la zona del complejo lipoproteína-pigmento.

Por tanto, tres antígenos son revelados con el suero de animales espontáneamente infestados que no son revelados con el suero inmune y uno es revelado con éste y no con aquel. Este último antígeno debe ser un componente minoritario presente en la bilis, quizás sea un antígeno procedente de la lisis de las fasciolas. Por el contrario, los otros tres componentes deben estar en la bilis en mayor cantidad que en el extracto. El íntimo contacto de estos antígenos con el hospedador y la persistencia de ellos en el mismo, ofrece una mayor estimulación del sistema inmunitario. Esta debe ser la causa de que sean revelados con el suero de animales infestados de una manera natural y no con los inmunisueros.

La hipótesis de que estos antígenos no revelados con el suero anti-extracto total de Fasciola, son antígenos de este parásito presentes en la bilis, ha quedado comprobada, como veremos a continuación, en una experiencia en la cual ensayamos sueros positivos con bilis negativas. En esta experiencia, solo obtuvimos los dos arcos

finales por inmunoelectroforesis, por lo que la posibilidad de que los antígenos no revelados con el inmunisero de Fasciola y si con los sueros positivos, no fueran de este parásito queda totalmente descartada. De ser antígenos de origen biliar se hubieran detectado además de los dos localizados en la zona del complejo.

En las bilis ovinas detectamos un total de 4 arcos de precipitación, uno de los cuales, localizado en la zona del complejo, se corresponde con el observado en la inmunoelectroforesis de bilis positivas con sus respectivos sueros.

Los dos antígenos localizados en la zona del complejo los hemos revelado al ensayar sueros de animales espontáneamente infestados, frente a bilis parasitadas. En una nueva experiencia hemos querido comprobar si estos antígenos eran también detectados en la bilis normal. La inmunoelectroforesis ha revelado exclusivamente los dos arcos de precipitación al final del canal, en la zona del complejo.

Paralelamente realizamos inmunodifusión de estos

sueros, con bilis de animales normales y con fasciolosis, al objeto de confirmar la identidad de las bandas en ambas bilis. Esta prueba reveló identidad total en dos de las bandas obtenidas.

Los dos antígenos del complejo los hemos revelado tanto con los sueros de animales parasitados como con los sueros inmunes de conejo. En este caso una explicación a esta detección pudiera ser que los extractos preparados para realizar las inmunizaciones contuvieran restos de bilis y al ser inyectados en los conejos se hubieran formado los correspondientes anticuerpos. De haber ocurrido esto, se hubieran revelado aparte de estos dos componentes alguno de los otros doce que hemos detectado en la bilis. El hecho de que estos dos mismos antígenos hayan sido revelados con los sueros de animales espontáneamente infestados, nos permite afirmar que en la fasciolosis animal tiene lugar la formación de anticuerpos que reaccionan con dos componentes biliares.

Puesto que el fenómeno de las reacciones cruzadas entre parásitos y sus hospedadores es bastante común,

quisimos comprobar si es que Fasciola hepática posee fracciones antigénicas de reactividad cruzada con estos dos componentes antigénicos.

Los ensayos realizados por inmunodifusión de sueros de animales espontáneamente infestados frente a bilis normal y extracto de Fasciola, revelaron identidad total en una de las bandas, la más interna de las dos que aparecen en los orificios de la bilis. La más externa no muestra identidad. Por su localización y forma no parece corresponder a ninguna del extracto.

Dado que las dos bandas reveladas en la bilis normal, por inmunodifusión, se localizan por inmunoelectroforesis en la zona del complejo, podemos decir que la fracción antigénica de Fasciola hepática ~~es~~ es común con uno de los componentes biliares, ^{que} tiene esta localización.

El fenómeno de la reacción autoinmune se concibe en función de la tolerancia natural adquirida. De acuerdo con Voisin, 1972 (119), existen tres mecanismos diferentes que permiten reunir las reacciones autoinmunes en otros tantos grupos: 1º) reacción autoinmune por ausencia de to-

lerancia natural; 2º) reacción autoinmune por un disfuncionamiento del sistema inmunitario y 3º) reacción autoinmune por ruptura de la tolerancia inmunitaria. En este tercer grupo la ruptura puede deberse a antígenos endógenos modificados o a antígenos exógenos que poseen reactividad cruzada con algún antígeno endógeno nativo.

Como hemos expuesto con anterioridad, en el curso de nuestras investigaciones, hemos encontrado que una fracción antigénica de Fasciola hepática, presenta reactividad cruzada con un antígeno biliar, que ligado a la bilirrubina forma un complejo. Frente a este antígeno, los animales espontáneamente infestados son capaces de elaborar anticuerpos.

En la fasciolosis animal, tiene pues lugar una reacción autoinmune similar a la del tercer grupo de Voisin. Los antígenos responsables de esta reacción, son exógenos al hospedador, antígenos del parásito, y por su similitud antigénica con los dos componentes biliares, son capaces de romper la tolerancia que el hospedador muestra frente a estos componentes que le son propios.

En hepatopatías humanas, Chisiu, 1972 (120), ha encontrado también una reacción inmune del tercer tipo en la que están implicados antígenos biliares, pero en ésta la ruptura de la tolerancia no se debe a antígenos exógenos de reactividad cruzada, como en nuestro caso, sino a antígenos específicos de la bilis. Este autor demuestra que, de los 8 antígenos específicos por él encontrados, el señalado con el número III, es el que tiene potencial autoantigénico en las enfermedades hepatobiliares. El tipo de anticuerpo producido es generalmente IgG, aunque a veces detecta también IgM. Para este autor, dos son los posibles mecanismos por los cuales el sistema inmunitario responde a este antígeno: coléctasis o malabsorción. Por estos mecanismos las proteínas biliares pueden alcanzar la circulación sanguínea, de esta manera, la tolerancia adquirida en el período perinatal puede quedar rota y aparecen los autoanticuerpos.

El antígeno biliar número III es una proteína normal, producida por secreción del epitelio biliar y está presente en la bilis de una manera constante. Este antígeno no debe su potencial antigénico a una modificación o desnaturalización patológica.

Posteriormente, Costica y col. 1974 (121), han encontrado también en hepatopatías humanas crónicas: hepatitis, cirrosis, neoplasia etc... autoanticuerpos, con frecuencia relativamente elevada, no solo frente al antígeno III sino también frente a los antígenos I, II, VI y VII. La inmunoglobulina encontrada por estos autores, ha sido constantemente del tipo IgG.

Una vez comprobada la existencia de anticuerpos frente a componentes biliares, en el suero de animales parasitados, quisimos comprobar también si estos anticuerpos se encontraban presentes en la bilis. A tal fin realizamos dos experiencias sucesivas. En una de ellas se ensayaron por inmunodifusión bilis de animales parasitados frente a bilis de animales normales. Los resultados fueron positivos, revelandose 2 bandas de precipitación. En la otra experiencia se ensayaron las mismas bilis parasitadas frente a sueros de animales normales. Puesto que los antígenos biliares son comunes con el suero, los resultados de las pruebas debían ser paralelos. Efectivamente, también fueron reveladas las dos bandas por inmunodifusión. La inmunoelectroforesis reveló un arco al final del canal.

En la bilis de animales parasitados, pueden existir tanto antígenos biliares como anticuerpos frente a estos antígenos. El que sean revelados unos u otros depende de que ambos no estén en equilibrio. Para que en una bilis se detecten anticuerpos es preciso que éstos estén en exceso con respecto al antígeno. Para que la revelación del antígeno tenga lugar debe ocurrir exactamente lo contrario. De hecho, en las experiencias realizadas a lo largo del presente trabajo, no ha sido posible detectar estos antígenos o anticuerpos en todas las bilis, que en número bastante elevado han dado resultados negativos.

Las infestaciones por Fasciola están usualmente acompañadas por una patología de los conductos biliares que incluye: hiperplasia del epitelio, infiltración fibrosa y engrosamiento de las paredes. Además, durante su fase de penetración, las fasciolas lesionan con frecuencia el hígado ocasionando hemorragias.

En Medicina humana ha sido comprobado que las enfermedades hepáticas crónicas suelen ir acompañadas de la producción de autoanticuerpos anti-tejido hepático, formados frente a antígenos modificados.

Nosotros hemos querido comprobar si en la fasciolosis animal tiene lugar también la formación de anticuerpos anti-tejido hepático ensayando, por inmunodifusión, sueros de animales parasitados, frente a extractos de hígado. En ninguno de los sueros ensayados obtuvimos bandas de precipitación.

En la schistosomiasis japónica, anticuerpos anti-tejido hepático, han sido descritos por Kurata y Noda, 1965 (122), y Kurata, 1966 (123), utilizando las técnicas de precipitación y hemaglutinación. En la fasciolosis deben existir también estos autoanticuerpos, el no haberlos detectado probablemente se deba a que la sensibilidad de nuestra técnica es menor que la de las empleadas por estos autores y si existen anticuerpos en pequeña cantidad no se revelan. Investigaciones con la prueba de hemaglutinación indirecta, serán llevadas a cabo en un futuro inmediato.

Para comprobar si en la bilis aparte de los anticuerpos que reaccionan con dos de sus antígenos existen también anticuerpos frente a otros componentes del parásito, efectuamos precipitación de las gamma globulinas de

la bilis con sulfato amónico a media saturación. Después de recogido y solubilizado, el precipitado se concentró cinco veces por pase de la solución a través de una membrana AMICON-S125. Estas gamma globulinas, precipitadas y concentradas, fueron ensayadas por inmunodifusión e inmunoelectroforesis con extractos de Fasciola a distintas concentraciones.

En ninguna de las muestras ensayadas, revelamos anticuerpos frente a otros antígenos de Fasciola distintos a los componentes biliares.

El hígado normal juega un papel importante en la biosíntesis de todas las proteínas del plasma exceptuando las gamma globulinas. En afecciones del hígado, las células hepáticas tienen capacidad para producir varios tipos de inmunoglobulinas.

Flagstad y Eriksen, 1974 (124), han observado por inmunofluorescencia que en becerros infestados con Fasciola hepática, tiene lugar la formación de inmunoglobulinas en el hígado. Cuando la infestación era simple, detectaban IgA, mientras que la síntesis de IgG fue el resulta-

do de infestaciones repetidas. Las células hepáticas de becerros normales, no demostraron la producción de ningún tipo de inmunoglobulinas.

Por otra parte, Gajos, 1970 (125), utilizando bilis de bovinos parasitados, ha detectado la presencia de anticuerpos en nivel poco elevado, debido a que las fasciolas presentes en el hígado actúan tanto de antígenos inmunizantes como neutralizantes. Solamente pudieron ser revelados cuando existía un exceso de anticuerpos.

Ninguno de los anticuerpos revelados por este autor, son elaborados frente a componentes biliares. Por el contrario, los que nosotros hemos detectado son exclusivamente éstos, quizás porque hubiera en las muestras ensayadas un exceso de estos anticuerpos y no de los elaborados frente a otros componentes del parásito.

En nuestras investigaciones hemos utilizado también 4 sueros humanos de individuos con fasciolosis confirmada por coproscopia y que nos fueron remitidos por la Dra Coelho Rombert del Instituto de Medicina Tropical de Lisboa. El pequeño volumen de los sueros sola-

mente nos ha permitido ensayarlos por inmunodifusión. Estos ensayos se realizaron frente a tres bilis, en las cuales habíamos detectado la presencia de tres sustancias antigénicas. De los cuatro sueros, uno dió resultado negativo, los otros tres resultaron positivos revelando un máximo de dos bandas de precipitación.

En los sueros humanos existen pues anticuerpos capaces de reaccionar con antígenos biliares. Si estos antígenos son del parásito o por el contrario son los antígenos de reacción cruzada, localizados en la zona del complejo lipoproteína-pigmento, no hemos podido comprobarlo, el volumen de cada suero fue tan reducido que no nos permitió realizar inmunoelectroforesis. En nuestro medio, la fasciolosis humana no es una helmintiasis frecuente, de aquí que estas investigaciones no se hayan realizado con la amplitud que hubieramos deseado.

6.- C O N C L U S I O N E S

- 1.- El análisis electroforético de la bilis ovina ha revelado la existencia de cinco fracciones proteicas, una de las cuales se encuentra ligada a la bilirrubina.
- 2.- Existe además en la bilis, una fracción lipídica, que se encuentra ligada también a la bilirrubina, formando un complejo lipoproteína-pigmento.
- 3.- Un total de 14 componentes antigénicos distintos han sido detectados en la bilis ovina normal por inmunoelectroforesis. Dos de estos componentes están localizados en la zona del complejo.
- 4.- De las 14 fracciones antigénicas detectadas, 8 son específicas de la bilis y 6 comunes al suero, siendo dos de estas fracciones comunes las detectadas en la zona del pigmento.
- 5.- La inmunoelectroforesis de un suero anti-gamma globulina ovina y de bilis ha demostrado que una de las dos

fracciones ligadas al complejo es una gamma globulina.

- 6.- En la bilis de animales parasitados por Fasciola hepática, existen antígenos propios de Fasciola, revelables unos por un inmunisero anti-extracto del parásito y otros por el suero de animales espontáneamente infestados.
- 7.- Los sueros de animales infestados por Fasciola de una manera natural, aparte de detectar los antígenos del parásito, presentes en la bilis, detectan también los localizados en la zona del complejo.
- 8.- Los extractos de Fasciola hepática poseen una fracción antigénica que tiene reactividad cruzada con uno de los componentes biliares ligados al complejo y frente al cual el hospedador elabora anticuerpos.
- 9.- La existencia, en el suero de animales espontáneamente infestados, de anticuerpos dirigidos frente a un componente del parásito, con reactividad cruzada con un componente biliar, nos permite concluir que en la

fasciolosis animal existe un fenómeno autoinmune, en el que la ruptura de la tolerancia inmunológica tiene lugar por la presencia de antígenos exógenos con reactividad cruzada con los del hospedador.

- 10.- Los anticuerpos elaborados por el hospedador frente a los dos componentes biliares se encuentran también presentes en la bilis de animales parasitados.
- 11.- En nuestras condiciones experimentales, no hemos detectado en los sueros de animales espontáneamente infestados, autoanticuerpos frente al tejido hepático.
- 12.- En la bilis de animales parasitados, no hemos revelado anticuerpos frente a antígenos específicos del parásito, debido probablemente a que al existir en ella antígenos, estos queden neutralizados por dichos anticuerpos.

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- CRAIG, C.F., FAUST, E.C. 1974
Parasitología clínica.
8ª edición, Salvat S.A. Barcelona

- 2.- GONZALEZ CASTRO, J. 1948
Aportación al conocimiento de la fasciolosis humana con motivo de algunos casos observados en Granada.
Rev. Ib. Parasitol. T. VIII, nº 2-3, pag. 248-341

- 3.- LIZCANO HERRERA, J. 1961
Distomatosis hepática en la zona de Trevélez (diagnóstico por las pruebas de floculación).
Rev. de Sanidad e Higiene Pública, 31: 1-23

- 4.- ELORZA, M.U. 1973
Attempt to eradicate fasciolosis in Guipuzcoa Province, Spain.
Boletín Informativo, Consejo General de Colegios Veterinarios de España, Suplemento científico, nº 197, 67-72

- 5.- FRAGA DE AZEVEDO, J., et COELHO ROMBERT, P. 1965
L'aplication de l'immunofluorescence au diagnostic de
la Fasciolose hepatiche.
Ann. Par. Hum. Comp. 40:529-542
- 6.- FROYD, G. 1974
Fascioliasis in Great Britain.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B 8 (15) pág. 504
- 7.- PITOIS, M. 1972
Results of an inquiry on the incidence of bovine fasciolia-
sis in the north of France after the results of the sani-
tary inspection at the Bethune abattoir, August 1970.
Bulletin Mensuel Societe Veterinaire Pratique de France,
56 (6), 331-338
- 8.- UENO, H., ALVAREZ, V.J. 1973
Observation on the prevalence of parasitic diseases in
cattle, especially fascioliasis, in the Dominican Republic.
National Inst. of Animal Health Quarterly, 13 (2), 59-68.
Res. Helminthological Abstracts, Vol.43, nº 7, pág. 550,
año 1974

- 9.- NORTON, R.A., MONROE, L. 1961
Infection by Fasciola hepática acquired in California.
Gastroenterology, 41:46-48 (citado por Craig y Faust, 1974)
- 10.- BURGI, K. 1936
Un cas de Distomatose du foi (F. hepática).
Mit. a. d. Grenzgeb. Med. u. Chir.- Nov. Tomo 44.
Ref., Rev. de Med. Trop. y Parasitol. Vol III. nº 6
pág. 538 (citado por Gonzalez Castro, 1948).
- 11.- KOURI, P. 1948
Rev. Med. Trop. Habana 4, 63-67, 77-87 (citado por Dawes,
B. y Hughes, D.L. 1964).
- 12.- RODRIGUEZ, C. 1952
Rev. Med. Cordoba, 40, 9-12 (citado por Dawes, B. y Hughes,
D.L. 1964).
- 13.- CARVAO GOMES, F., SILVA XAVIER, A. 1956
A proposito de um novo caso de Fascioliose hepatica huma-
na, ensaio sobre a tecnica de fixação do complemento pa-
ra diagnostico serologico.
Anais do Instituto de Medicina Tropical, Lisbon 13 (4),

901-910 (English, French summaries pág. 910).

- 14.- SAMPAIO SILVA, M.L., CAPRON, A., CAPRON, M. 1974
Human Fascioliasis in Portugal.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B8 (24),pág.515.
- 15.- FACEY, R.U., and MARSDEN, P.D. 1960
Fascioliasis in man: An outbreak in Hampshire.
Br. Med. J. 2, 619-625.
- 16.- ONTANEDA, M., RIVADENEIRA, J., y CHAVEZ, J. 1968
Fascioliasis hepática. Presentación de un caso.
Rev. Ecuatoriana de Med. y Ciencias Biológicas, Vol. VI,
nº 2, pág. 87-93.
- 17.- MOHSENIN, H., EBRAHIMI, M.A. 1969
Human fascioliasis in Iran, report of a case with Fasciola
hepática in biliary ducts.
Bull. Soc. Pathol. Exot. 62:871-874.
- 18.- CESAR NAQUIRA, V., FRIDA NAQUIRA., CESAR ALEMAN., WALTER
ANGULO y otros 1972

Distomatosis hepática humana en dos localidades del Valle del Rio Mantaro.

Rev. Peruana Med. Trop. Univ. Nac. San Marcos, Vol. 1
pág. 1-66.

19.- KLUSKA, J., SZRAJDA, B., and SAWRASEWICZ, B. 1973

A case of fasciolosis in a four-years-old girl.

Wiadomosci Parazytologiczne, Tomo XIX, nº 6, pág. 827.

20.- DRAGHICI, O., VASADI, T., DRAGHICI, G., TINTAREANU, L.
1974

Fasciolose humaine en liaison avec 11 cas observes.

Proceedings Third International Congress of Parasitology.

München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B8 (30),pág.521.

21.- DESCHIENS, R. 1958

Les distomatoses hepaticues humaines en France.

Ann. Inst. Past. 94:256-271.

22.- COUDERT, J. et TRIOZON, F. 1957

Apercus nouveaux sur l'epidemiologie de la distomatose hepaticue dans la region lyonnaise.

Press. Med. 65:1586.

- 23.- LESEQ, R., GNAMEY, D., DUBOIS, B., FARRIAUX, J.P.,
VERNES, A., CAPRON, A., FONTAINE, G. 1972
An unusual case of fascioliasis with neurological signs
in a child.
Semaine des Hôpitaux de Paris, 48th Year, 49/12 Annales
de Pédiatrie 19 (12) 3253-3256 (885-888).
Resumen, Helm. Abst. Series A, 1973, Vol.42, nº 6, 2239
- 24.- KANEDA, Y., ASAMI, K., FUEKI, K., SUGI, S., MURATA, A. 1974
Report of a case of human fascioliasis found in Knagawa
Pref.
Jap. J. Parasitol. 23, 4, 211-219
- 25.- MARTIN DE LA CALLE, P. 1890
Un caso de Distomatosis hepática en el hombre.
Rev. Med. Cir. Pat. 27:505-509. (citado por Gonzalez
Castro, 1948).
- 26.- DOMINGUEZ, CUBERO y CAMACHO. 1944
Distomatosis hepática.
Soc. Med. Hosp. Sevilla, Ref. Act. Med. 3:234 (citado
por Gonzalez Castro, 1948)

- 27.- TORRES LOPEZ, A., GONZALEZ CASTRO, J., y SANCHEZ JIMENEZ, R.
1945
Sobre un caso de parasitismo por Fasciola hepática.
Rev. Iber. Parasitol. (Tomo extraordinario):271-275.
- 28.- GARCIA BARON, A., 1950
Rev. Clin. Españ. T. 38, nº 4, pág 312. (citado por Morell
Cuellar y Gonzalez Castro, 1951).
- 29.- MORELL CUELLAR, L., y GONZALEZ CASTRO, J. 1951
Nuevo caso de distomatosis humana por Fasciola hepática.
Rev. Iber. Parasitol. T. XI, nº 3, pág. 271-281.
- 30.- HERNANDEZ GUIO, C., PEREZ GOMEZ, A., y RUIZ ALONSO, J. 1967
Un caso de distomatosis hepática por Fasciola.
Revista Clinica Española, t. 105, nº 2, pág. 146.
- 31.- LANG, B.Z. 1966a
Studies on host-parasite relationships of Fasciola hepática
ca in the white mouse.
Unpublished doctoral dissertation, University of North
Carolina. Chapel Hill, North Carolina. (citado por Lang,
1967).

32.- LANG, B.Z. 1966b

Host-parasite relationships of Fasciola hepática in the white mouse I. Response to a primary infection.

J. Elisha Mitchell Sci. Soc. (citado por Lang, 1967).

33.- LANG, B.Z. 1967

Host-parasite relationships of Fasciola hepática in the white mouse II. Studies on acquired immunity.

Journal of Parasitology, 53, 21-30.

34.- LANG, B.Z. 1968a

Acquired immunity to Fasciola hepática in the laboratory white mouse.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 17, pág. 561-567.

35.- LANG, B.Z. 1968b

Host-parasite relationships of Fasciola hepática in the white mouse III. Worm transfer.

Proc. Okla. Acad. Sci. 47:81-84.

36.- LANG, B.Z. and DRONEN, N.O. 1972

Host-parasite relationships of Fasciola hepática in the

white mouse IV. Studies on worm transfer and the induction of acquired immunity by worms of different ages. Journal Parasitol. Vol. 58, nº1, 84-87.

37.- LANG, B.Z. 1974

Host-parasite relationships of Fasciola hepática in the white mouse V. Age of fluke responsible for the induction of acquired immunity.

The Journal of Parasitology, Vol. 60, nº 1, pág 90-92

38.- LANG, B.Z. 1974

Host-parasite relationships of Fasciola hepática in the white mouse VI. Studies on the effects of immune and normal sera on the viability of young worms transferred to normal recipients.

The Journal of Parasitology, Vol. 60, nº 6, pág.925-929.

39.- HAYES, T.J., BAILER, J., and MITROVIC, M. 1972

Immunity in rats to superinfection with Fasciola hepática.

Journal Parasitol. Vol.58, nº 6, pág. 1103-1105.

40.- HAYES, T.J., BAILER, J., and MITROVIC, M. 1973

Immunity to Fasciola hepática in rats: the effect of two

different levels of primary exposure on superinfection.
The Journal of Parasitology. Vol. 59, nº5, pág. 810-812.

- 41.- HAYES, T.J., BAILER, J., and MITROVIC, M. 1974
Acquired immunity and age resistance in rats with chronic fascioliasis.
The Journal of Parasitology, Vol. 60, nº 2, pág. 247.
- 42.- ARMOUR, J., DARGIE, J.D., DOYLE, J.J., MURRAY, M., ROBINSON, P., RUSHTON, B. 1974
Immunisation against fascioliasis.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B 8 (5) pág.494.
- 43.- GOOSE, J., and MACGREGOR, M. 1974
Naturally acquired immunity to Fasciola hepática in the rat.
Helminthological Abstracts, Vol. 43, nº 1.
- 44.- ROSS, J.G. 1966
Studies of immunity to Fasciola hepática. Naturally acquired immunity in rabbits.
Br. Vet. J. 122, 209.

- 45.- KENDALL, S.B., HEBERT, N., PARFIT, J.W., PEIRCE, M.A. 1967
Resistence to reinfection with Fasciola hepática in rabbits.
Exper. Parasitol. 20, 2, pág. 242-247.
- 46.- KENDALL, S.B., y SINCLAIR, I.J. 1971
Res. Vet. Sci. 12, 74 (citado por Sinclair y Joyner, 1974).
- 47.- SINCLAIR, I.J. and JOYNER, L.P. 1974
The effect of the administration of a homologous antigen on the establishment of F. hepática in the rabbit.
Res. Vet. Sci. 16, 320-327.
- 48.- THORPE, E. 1965
Res. Vet. Sci. 6, 498 (citado por Sinclair y Joyner, 1974).
- 49.- FORTMEYER, H.P. 1975
Extra-hepatic immunity in Fasciola hepática infections of rabbits.
Helmintological Abstracts. Vol. 44, nº 1.
- 50.- TAYLOR, E.L. 1949
The epidemiology of fascioliasis in Britain.

Proc. 14th Int. Vet. Congr. London, 2, 81 (citado por Dawes y Hughes, 1964).

51.- ROSS, J.G. 1965a

Experimental infections of cattle with Fasciola hepática: a comparison of low and high infection rates.

Nature London, 208, 907.

52.- ROSS, J.G. 1966a

Experimental infections of cattle with Fasciola hepática. Challenge infections of previously infected calves and acquired self cure.

Nature London, 212, 1464.

53.- ROSS, J.G. 1967a

Experimental infections of cattle with F. hepática: the production of an acquired self cure by challenge infection.

J. Helm. 41:223-228.

54.- DOYLE, J.J. 1971

Acquired immunity to experimental infection with F. hepática in cattle.

Res. Vet. Sci. 12, 527-534.

55.- OVER, H.J. 1974

Reinfections with F. hepática in cattle.

Proceedings Third International Congress of Parasitology.

München, 25-31 August 1974, Vol. 1, Section B 8 (10) pág. 499.

56.- BUGGE, G. 1927

Comparable investigations into fascioliasis in cattle and sheep.

Tieraztl. Resch. 33, 833-838.

57.- DURBAN, C.G. 1952

Longevity of the liver fluke F. hepática in sheep.

Proc. Helm. Soc. Wash. pág 19-120.

58.- LEIPER, J.W. 1938

J. Helm. 16, 173-176 (citado por Dawes y Hughes, 1964).

59.- BORAY, J.C. 1967

Studies on experimental infections with F. hepática, with particular reference to acute fascioliasis in sheep.

Annals Tropical Medicine Parasitology, 61, pág. 439-456.

- 60.- LANG, B.Z., LARSH, J.E.Jr., WEATHERLY, N.F. and GOULSON, H.T. 1967
Demostration of immunity to F. hepática in recipient mice given peritoneal exudate cells.
Journal of Parasitology, 53, 208-209.
- 61.- CORBA, J., ARMOUR, J., ROBERTS, R.J. and URQUHART, G.M. 1971
Transfer of immunity to Fasciola hepática infection by lymphoid cell.
Res. Vet. Sci. 12(3): 292-295.
Resumen: Helmint. Abst. Vol. 40, part. 4, nº 4725, pág.548.
- 62.- SINCLAIR, K.B. 1971
Resistance to F. hepática in sheep: attempts to transfer resistance with lymph node and spleen homogenates.
Br. Vet. J. 127 (9): 408-418.
- 63.- WICKERHAUSER, T. 1961
Immunobiologic diagnosis of fascioliasis II. The in vitro action of immune serum on the young parasitic stage of F. hepática. A new precipitin test for fascioliasis.
Vet. Arch. (Zagreb) 31:71-80.

- 64.- DAWES, B. and HUGHES, D.L. 1964
Fascioliasis: the invasive stages of Fasciola hepática
in mammalian hosts.
Adv. Parasit. 2:97-168.
- 65.- HAYES, T.J., BAILER, J. and MITROVIC, M. 1974
Serum transfer of immunity to Fasciola hepática in rats.
J. Parasitol. 60:722-723.
- 66.- HAYES, T.J., BAILER, J. and MITROVIC, M. 1974
Studies on the serum transfer of immunity to Fasciola
hepática in the rat.
The Journal of Parasitology, Vol. 60, nº 6, pág. 930-934.
- 67.- DARGIE, J.D., ARMOUR, J. and URQUHART, G.M. 1973
Studies on immunity to Fasciola hepática.
Parasitology 67 (Suppl.):XXV.
- 68.- ARMOUR, J. and DARGIE, J.D. 1974
Immunity to Fasciola hepática in the rat. Successful
transfer of immunity by lymphoid cells and by serum.
Experimental Parasitology 35, 381-388.

- 69.- KERR, K.B. and PETHOVICH, D.L. 1935
Active immunity in rabbits to the liver fluke Fasciola hepática.
J. Parasitol. 21, 319.
- 70.- URQUHART, G.M., MULLIGAN, W. and JENNINGS, F.W. 1954
Artificial immunity to Fasciola hepática in rabbits.I. Some studies with protein antigens of F. hepática.
Journal of Infections Diseases, 94(2):126-133.
- 71.- HEALEY, G.R. 1955
Studies on immunity to F. hepática in rabbit.
Journal of Parasitology, 41, suppl. 25.
- 72.- ERSHOV, V.S. 1959
Proc. XVith, int. vet. Congr. Madrid 1, 279-289 (citado por Dawes y Hughes, 1964).
- 73.- HUGHES, D.L. 1962b
Observations on the immunology of F.hepática infections in mice and rabbits.
Parasitology, 52, 4P.

74.- HUGHES, D.L. 1963

Some studies on the host-parasite relations of Fasciola hepática.

Ph. D. Thesis, University of London (citado por Dawes, 1964)

75.- ROSS, J.G. 1967

Studies of immunity to Fasciola hepática. Acquired immunity in cattle, sheep and rabbits following natural infection and vaccine procedures.

Journal of Helminthology, Vol. 41, nº 4, pág: 393-399

76.- DRAGNEVA, N. 1974

Vaccination against Fasciola hepática with somatic and metabolic antigens.

Helminthological Abstracts, Vol. 43, nº 6.

77.- DAWES, B. 1964

"A preliminary study of the prospect of inducing immunity in fascioliasis by means of infections with X-irradiated metacercarial cyst and subsequent challenge with normal cysts of Fasciola hepática L".

- 78.- THORPE, E. and BROOME, A.W.J. 1962
Vet. Rec. 74, pág. 755-756 (citado por Dawes y Hughes, 1964)
- 79.- NANSEN, P. 1974
Studies on the resistance to Fasciola hepática in calves vaccinated with attenuated metacercariae.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B 8 (7) pág.496.
- 80.- ERIKSEN, L. and FLAGSTAD, T. 1974
Studies of immunity to Fasciola hepática infection in vaccinated rats.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B 8 (2) pág.491.
- 81.- DARGIE, J.D., ARMOUR, J. and MURRAY, M. 1974
Immunological mechanisms in fascioliasis.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August 1974, Vol.1, Section B 8 (6) pág.495.
- 82.- FRAGA DE AZEVEDO, J. y CARVAO GOMES, F. 1959
A aplicação de algumas provas serologicas e cutâneas no diagnostico da certas helmintiasas.

Anais do Instituto de Medicina Tropical. Lisbon 16 (1/14)
pág. 5-13

83.- WIKERHAUSER, T., BARTULIC, V. 1961

Immunobioloska diagnostika Fascioloze. I o urijednosti somatskog, polisáharudnog i metabolickog antigena za intrakutani test kog goveda.

Veterinarski Arhiv, 31, pág. 1-7.

84.- PAUTRIZEL, R., BAILENGER, J., GOUT, M. 1961

Diagnostic immunologique de Distomatose á Fasciola hepatica.

Ann. Bio. Clin. 3-4:1-9.

85.- MAEKAWA, K., KUSHIBE, M. 1961

Studies on allergen of Fasciola hepatica. III. Separation allergenic substances (C₅ and P₄).

Agr. Biol. Chem. 25, pág. 542-549.

86.- MAEKAWA, K., KUSHIBE, M. 1961

Studies on allergen of Fasciola hepatica. IV. Composition of allergen P₄.

Agr. Biol. Chem. 25, pág. 550-552.

- 87.- MAEKAWA, K., KUSHIBE, M. 1964
Studies on allergen of Fasciola hepatica. Constitution
of allergen P₄.
Agr. Bio. Chem. 28, pág. 382-387.
- 88.- FAVATI, V., DELLA CROCE, G. 1965
Sulla diagnosi in vivo di distomatosi hepatica nel bovino.
Indagini sul valore combinato degli esami coprologico ed
allergico.
Annali Fac. Med. Vet. Uno. Pisa (17), pág. 75-86
- 89.- BENEX, J., LAMY, L., GLEDEL, J. 1959
Etude de la reaction du complement a l'antigen distomien
chez le mouton.
Bulletin de la Societé de Parasithologie Exotique. 52 (1),
pág. 83-87.
- 90.- PAUTRIZEL, R., BAILENGER, J. 1961
Les examens biologiques au course de la distomatose hepa-
tique humaine.
J. Med. Bord. et Sud. Ouest, 138, pág. 876-881.

91.- YAKHONTOV, B.V. 1973

Diagnosis of fascioliasis by the complement fixation reaction.

Helmintological Abstracts, vol. 42, nº5. pág. 376.

92.- SUSUMI, S., KURAMOTO, T., ICHIHARA TSUYOSHI and ICHIHARA TSURVO. 1958

Studies on the rapid flocculation test for Fascioliasis.

I. Investigation on the antigens and technique for the rapid flocculation test.

Japanese Journal of Parasitology, 7 (6), pág. 666-673.

93.- ATIENZA FERNANDEZ, M. 1965

Empleo de partículas inertes para el diagnóstico de la distomatosis hepática.

Tesis Doctoral. Instituto "Lopez-Neyra" de Parasitología.

94.- BENEX, J. 1964

Le diagnostic serologique pratique de la distomatose.

Une methode d'agglutination á l'aide d'antigene absorbé sur des particles de latex.

Bull. Soc. Path. ex. 57, pág. 495-502.

- 95.- GOMEZ GARCIA, V. 1968
Serologia de la distomatosis hepática.
Rev. Iber. Parasitol. vol. 28 (4), pág. 423-454.
- 96.- SIELICKA, R. 1962
Odczyn hemaglutynacji z antygenem Fasciola hepatica.
Medycyna Weterynaryjna 18 (5), pág. 279-283.
- 97.- BIGUET, J., ROSE, G., CAPRON, A. 1965
Le diagnostic de la distomatose a Fasciola hepatica por
la reaction d'hemagglutination comparaison avec les re-
sultats de l'immuno-electrophorese et de la reaction d'he-
molyse.
Bull. Soc. de Pathologie exotica. T. 58, nº 5, pág. 866-878.
- 98.- TRIBOULEY, M. J., TRIBOULEY-DURET, M. J., IRRIBARREN,
M. J. 1969
Mise en evidence des anticorps specifiques de Fasciola
hepatica par hemagglutination passive en utilisant la glu-
taraldehyde come agent de conplage.
C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris, Serie D, 268 (17),
pag. 2215-2217.

- 99.- COONS, A.H., CREEH, H.J., JONES, R.N.E. 1941
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.
P. Soc. Exp. Biol. 47, pag. 200-202.
- 100.- FRAGA DE AZEVEDO, J. et COELHO ROMBERT, P. 1965
L'application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Fasciolose hepatiche.
Ann. Par. Hum. Comp. 40, pag. 529-542.
- 101.- COUDERT, J., GARIN, J.P., AMBROISE-THOMAS, P., KIEN TROUNG THAI, DESPEIGNES, J., POTHIER, M.A. 1967
La reaction d'immunofluorescence sur coupes de Fasciola hepatica, une nouvelle technique pour le serodiagnostic de la Distomatose (1^{er} resultats).
Bull. Soc. Path. Exot. 60 (1), pag. 71-79.
- 102.- AMBROISE-THOMAS, P. 1969
Etude sero-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence.
These Faculté de Medecine de Lyon.

- 103.- KIEN TROUNG, T., MOJON, M. et AMBROISE-THOMAS, P. 1970
Diagnostic et controle post-therapeutique de la fasciolose humaine par immunofluorescence sur coupes de F. hepatica. Etude de 349 cas.
J. Parasit. 56 (4, sect. 2) pag. 347-348, n° 637.
- 104.- MOVSESIJAN, M., BOROJEVIC, D. 1970
Used of fluorescent microscopy in the diagnosis of some parasitic infections of sheep (Fasciola hepatica and Dicrocoelium filaria).
Veterinarski Glasnik 24, pag. 1019-1022.
- 105.- DEELDER, A.M. 1975
Immunodiagnosis of some helminth infections, using the defined antigen substrate spheres (DASS) system.
Ann. Soc. Belge Med. Trop. 55, 5, pag. 469-472.
- 106.- TEODOROVIC, D., BERKES, J., MILOVANOVIC, M. 1963
Diagnosis of liver-fluke (Fasciola hepatica) infection in human beings by means of immunoelectroforesis.
Nature London, 198 (4876) 204.

- 107.- CAPRON, A., BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ROSE, G. 1964
Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique
de la distomatosis humaine á Fasciola hepática. Mise en
evidence d'anticorps seriques par immunoelectrophorese.
Presse Medical, 72 (52), pag. 3103-3107.
- 108.- BIGUET, J., CAPRON, A., TRAN VAN KY, P. 1962
Les antigénes de Fasciola hepática. Etude électrophoréti-
que et immunoélectrophorétique. Identification des frac-
tions et comparaison avec les antigénes correspondant á
sept autres Helminthes.
Annales de Parasitologie, 37, pag. 221-231.
- 109.- GEYER, E. 1967
Electrophoretische Analysen an Fasciola hepatica total ex-
thrackten.
Z. Parasitekde, 28: 352-369.
- 110.- SEWELL, M. 1968
Studies on the metabolic products of Fasciola hepatica.
Parasitology, 58 (4), 2P.

- 111.- CUPERLOVIC, K., MOVSESIJAN, M., LALIC, R. 1974
Studies on antigens of Fasciola hepatica.
Proceedings Third International Congress of Parasitology.
München, 25-31 August, Vol. 2, Section D 7 (4) pag. 1149.
- 112.- GAJOS, E. 1969
Study of precipitating antibodies to Fasciola hepatica in
infected cattle and in immunized rabbits.
Arch. Inst. Past. Tunis, 46: 199-203.
- 113.- GONZALEZ CASTRO, J., GOMEZ GARCIA, V., ATIENZA FERNANDEZ,
M. 1966
Dispositivo para electroforesis, inmunolectroforesis e
inmunodifusión en microplacas de agar con matrices de
plástico.
Rev. Iber. Parasitol. 26 (4):405-426.
- 114.- VERSCHURE, J.C.M. 1956
Electro-chromograms of human bile.
Clinica Chimica Acta, Vol. 1, pag. 38-48.

115.- RAWSON, A.G. 1962

Human bile proteins-I. Proteins identified by antibody to human serum.

Clinical Chemistry, 8, 310.

116.- VERSCHURE, J.C.M., MIJNLIEFF, P.F. 1956

The dominating macromolecular complex of human gallbladder bile.

Clinica Chimica Acta, Vol. 1, pag. 154.

117.- VERSCHURE, J.C.M., DE WAEL, J., MIJNLIEFF, P.F. 1956

Further investigations on the macromolecular complex in human bile.

Clinica Chimica Acta, Vol. 1, pag 511.

118.- CHISIU, N.ST. 1965

Constituenti antigénici proprii și de origine sanguină în bila hepatică și veziculară umană studiu imunoelectroforetic.

St. Cerc. Biochim. 8, 4, pag. 427-440.

119.- VOISIN, G.A.

Phénomène auto-immunitaire sa nature et sa signification.

Immunologie, Paul Bordet, Flammarion Médecine-Sciences,
20 rue de Vaugirard, Paris VI^e, Chapitre XXVI, pag. 1162,
1972.

120.- CHISIU, N.ST. 1972

Bile specific protein autoantibodies in the human blood
serum.

Revue Roumaine de Biochimie, 9, (2) pag. 103-107.

121.- COSTICA, I., DOMITRIU, M., BENEA, F. 1974

Reaction auto-immune "de type Chisiu" dans les hepatopa-
thies chroniques.

L'information médicale roumaine, n^o 1, pag. 30-34.

122.- KURATA, M., NODA, R. 1965

Detection of circulating-autoantibodies in experimental
Schistosomiasis Japonica.

The Kurume Medical Journal, vol. 12, n^o 1.

123.- KURATA, M. 1966

Autoimmunity in Schistosomiasis Japonica.

The Kurume Medical Journal, vol. 13, n^o 4.

124.- FLAGSTAD, T., ERIKSEN, L. 1974

Hepatic Immunoglobulin Synthesis in Fasciola hepatica
infected calves.

Res. Vet. Sci. 17, pág. 59-63.

125.- GAJOS, E. 1970

Etude des anticorps précipitans anti-Fasciola hepatica
chez les bovins infestés et chez les lapins immunisés.

Archivos del Instituto Pasteur de Tunes. Vol.46-47,
pág. 199-203.