

IDENTIFICACION, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE ANTIGENOS PARA EL  
DIAGNOSTICO DE LA FASCIOLIASIS EN RUMIANTES.

J. Maisonnave  
M. Carballo  
J. Battistoni  
U. Benavfdez  
M. C. González  
A. Pazos

RESUMEN

Se estandarizó y controló la producción de antígenos de secreción/excreción de *Fasciola hepática* controlando el transporte y las condiciones de incubación parasitaria y mediante la inhibición de proteasas durante la técnica de producción.

Se halló que el PMSF (fluormo de fenil-metil-sulfonil) resultó ser un inhibidor de proteasas. Los patrones de electroforesis de los antígenos obtenidos se reprodujeron.

La inmunolectrotransferencia contra sueros de bovinos mostraron 3 áreas de antígenos de posible valor diagnóstico (más alto que 97.4 KD, entre 66 y 31 KD e inferiores a 21.4 KD).

El diagnóstico de la fascioliasis, necesario para estudios sanitarios y epidemiológicos, presenta aún hoy problemas de difícil resolución. Los métodos coprológicos son de alta especificidad pero de muy baja sensibilidad, comprobándose la existencia del parásito en bajo número de infecciones. Por otro lado, los métodos serológicos, si bien pueden ser de una mayor sensibilidad, presentan además problemas de especificidad debido a reacciones cruzadas con otras parasitosis.

Los objetivos generales de este trabajo son: 1) Producción de antígenos de

---

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UROU  
Unidad de Biotecnologías de la Salud, UROU  
Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, UROU

c.c.3.1

excreción/secreción (E/S) de F. hepática; 2) Caracterización e identificación de Ags. de valor diagnóstico; 3) Purificación y producción a escala de laboratorio de los Ags. de valor diagnóstico y 4) Evaluación de la capacidad diagnóstica mediante técnicas inmunoquímicas en animales infectados experimental y naturalmente. En esta comunicación preliminar se expone los resultados obtenidos de los objetivos 1) y 2).

Los métodos empleados para la caracterización de los Ags. de E/S fueron: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), inmunoelectrotransferencia (western blot).

#### RESULTADOS:

##### 1) Obtención de Ags. de E/S.

Se logró estandarizar la producción de Ag. de E/S, obteniéndose lotes de patrón electroforético idéntico (n = 6). Esta reproducibilidad se logró estudiando dos variables: condiciones de transporte e incubación de las fasciolas e inhibidores de proteasas en los Ags. de E/S.

- Condiciones de transporte e incubación: los parásitos fueron transportados desde el frigorífico al laboratorio ya sea en bilis bovina o en tampón de fosfato salino (PBS). Aquellas transportadas en bilis bovina mostraron mayor vitalidad en el laboratorio comparadas con las transportadas en PBS. La pérdida de vitalidad de las fasciolas transportadas en PBS puede conllevar a una degradación proteica (acción de proteasas) que probablemente contribuya a la falta de reproducibilidad de los antígenos obtenidos. Durante la selección e incubación de las fasciolas para la producción de antígenos, fue de suma importancia el mantenimiento de las mismas a 37 °C para la conservación de una adecuada vitalidad de las mismas.

- Uso de inhibidores de proteasas: dado que el procedimiento completo de producción de antígenos de E/S de F. hepática se realiza a 37 °C, los problemas de degradación proteica debidos a enzimas propias del parásito adquieren relevancia.

Los antígenos producidos en ausencia de inhibidores de proteasas presentaron un número alto de fracciones proteicas de bajo peso molecular indicativo de degradación proteolítica. El estudio realizado para seleccionar el inhibidor más adecuado, comprobó que el PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) es comparable, en cuanto a la capacidad de inhibición, al leupeptin y al E-64 (recomendamos en la literatura para proteasas de F. hepática). Por consiguiente, se optó por el PMSF en la producción de Ag. de E/S por razones de disponibilidad y costo. Finalmente, la utilización de inhibidores de proteasas durante la producción de antígenos permitió obtener un patrón electroforético reproducible de los mismos.

##### 2) Caracterización de antígenos de valor diagnóstico.

Los productos proteicos de E/S fueron caracterizados luego de ser separados en gel de poliacrilamida según su peso molecular y transferidos electroforéticamente a nitrato de celulosa. La detección de fracciones antigénicas específicas se realizó con antiseros provenientes de sueros bovinos positivos, comprobados por coprología; como control negativo se utilizó un suero bovino de ternero lechal de área libre de fasciola. Esta técnica demostró la presencia de bandas de reacción específicas antígeno/anticuerpo entre los rangos de pesos moleculares siguientes: a) por encima de 97 KD, b) entre 66 y 31 KD y c) por debajo de 21 KD. Asimismo se encontró en el patrón inmunoelectroforético, una banda inespecífica cercana a 30 KD, la que debe ser tenida en cuenta en los futuros procesos de purificación.

SUMMARY

The production of F. hepatica excretion/secretion antigens has been standardized by controlling transport and parasite incubation conditions and by inhibiting proteases during the production procedure.

PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) has been found to be a suitable proteases inhibitor; the antigen's electrophoretic patterns obtained were reproducible.

The westernblot against bovine sera showed 3 areas of antigens of possible diagnostic value (higher than 97.4 KD; between 66 and 31 KD and lower than 21.4 KD).