

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



## APLICACION DE LA PRUEBA MICRO ELISA EN LA SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA FASCIOLASIS BOVINA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNIA  
P R E S E N T A

**VICTOR MANUEL TRUEBA COURET**

ASESORES: M. V. Z. MANUEL RAMIREZ VALENZUELA  
M. V. Z. ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ  
MEXICO, D. F. 1981



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

	Pag.
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	2
II. MATERIAL Y METODOS.....	6
II.1. Preparación de Antígenos.....	6
II.1.a) Antígeno A1.....	6
II.1.b) Antígeno A2.....	7
II.1.c) Antígeno A3.....	7
II.2. Obtención de Sueros Testigo.....	8
II.3. Procedimiento de micro-ELISA.....	8
II.4. Areas Muestreadas.....	15
II.4.a) Zona Templada.....	15
II.4.b) Zona de Trópico Húmedo.....	16
III. RESULTADOS.....	18
III.1. Antígenos.....	18
III.2. Prueba micro-ELISA en Santa María Rayón, Edo. - de Méx.....	20
III.3. Prueba micro-ELISA en Hueytamalco, Puebla.....	24
IV. DISCUSION.....	27
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. BIBLIOGRAFIA.....	35
VII. APENDICE.....	42

RESUMEN.

Este trabajo se realizó con el objeto de utilizar en un estudio seroepidemiológico la prueba de micro-ELISA que emplea una anti Ig-G bovina marcada con un enzima, para detectar anticuerpos en contra de Fasciola hepatica. La prueba micro-ELISA fue realizada en el Centro Nacional de Parasitología Animal, - Fideicomiso Campaña Nacional contra la Garrapata y en el Departamento de Medicina Preventiva, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Se elaboraron tres preparaciones de antígenos somáticos (A1, A2, A3) a partir de trematodos adultos, obtenidos de hígados decomisados en el rastro de Ferrería. Las concentraciones óptimas de proteínas de los antígenos para estandarizar la prueba micro-ELISA fueron para A1, 7.5 nanogramos / 0.5 ml; para A2, 12.5 nanogramos / 0.5 ml y para A3, 34.3 nanogramos / 0.5 ml. En el estudio seroepidemiológico se usó el antígeno A1. Se estudiaron 38 sueros de bovinos procedentes de una zona templada en Santa María Rayón, Edo. de México. Además se usaron 88 sueros de una zona tropical húmeda, en Hueytamalco, Puebla. En el estudio seroepidemiológico de los bovinos de la zona templada, el 94.7% de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra Fasciola hepatica, mientras que en la zona de trópico húmedo, fue del 18.18%.

## 1. INTRODUCCION.

La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria importante - ya que afecta a los bovinos, ovinos y caprinos, ocasionando -- pérdidas económicas, como la baja en la producción láctea, de- ficiencia en la conversión del alimento, predisposición a enfer- medades bacterianas, decomiso de hígados afectados en los ras- tros y en ocasiones, la muerte del animal ( 4 ).

En el frigorífico de Villahermosa, Tabasco, se encontró - un 75% de hígados afectados por Fasciolosis bovina ( 2 ). En un estudio comprendido en el período de 1965-1968, se encontró que el decomiso en el rastro de Ferrería, fué de un total de - 52,404 hígados, con un equivalente de 439,429 kg. El 48.7% del ganado afectado procedía de los estados de Tabasco y Chiapas y las pérdidas correspondieron a \$ 760,251, calculado con un pre- cio de \$ 1.75 por kilogramo de vísceras, según lo señalado en- ese año por la Secretaría de Industria y Comercio ( 18 )..

Otros trabajos en México citan una infección de 89.3% por Fasciola hepatica en ganado bovino en pastoreo y de 70.1% en - el ganado estabulado en los Valles de Morelia y Querétaro -- ( 32 ). En el estado de Hidalgo, Municipio de Tulancingo, se- detectó una infección de 74.8% ( 14 ), en el estado de Jalis- co, en los Municipios de Atoyac y Amacueca, de 35.7% y 44.1% - respectivamente ( 41 ). En inspecciones macroscópicas de híg- ados en rastros de diferentes estados de la República, se encon- traron solamente dos localidades libres de ésta parasitosis, -

Saltillo, Coahuila y Mérida, Yucatán ( 29 ).

El diagnóstico de la Fasciolosis in vivo, se realiza básicamente con exámenes clínicos y pruebas de laboratorio, como lo son las técnicas coproparasitológicas e inmunológicas.

La técnica cualitativa mas empleada para el diagnóstico de Fasciolosis es la que se realiza por medio de la detección de huevecillos en las heces fecales, conocida como prueba de sedimentación. Sin embargo es inexacta, debido a la actividad biológica del trematodo, la cual se manifiesta por una disminución del número de huevecillos en las heces fecales después de la semana 30 de infestado el bovino. Por lo tanto los resultados coproparasitológicos, estarán condicionados al tiempo de infestación y a la actividad biológica del parásito -- ( 10 ).

Entre las pruebas inmunológicas utilizadas para el diagnóstico de la Fasciolosis, se cita a la prueba de intradermoreacción ( 17 ), que detecta la hipersensibilidad retardada. Consecuentemente, proporciona información sobre la inmunidad celular en contra del parásito. Las pruebas de tipo serológico que han sido empleadas para detectar anticuerpos específicos contra Fasciola hepatica son: fijación de complemento ( 19 ), inmunofluorescencia ( 24 ), contra-inmunolectroforesis ( 22 ), precipitación en gel ( 25 ), hemoaglutinación ( 25 ) e inmunoensayo en capa delgada ( 25 ), utilizándose algunas de éstas no solo con fines diagnósticos sino también,

en estudios seroepidemiológicos.

Recientemente se ha puesto especial atención a marcadores enzimáticos conjugados a antígenos o anticuerpos. Algunos investigadores, siguiendo la técnica descrita por Engvall y Perlmann ( 13 ), han adoptado la prueba denominada "Prueba de Inmuno-Adsorción con enzima conjugada (ELISA)"\*( 43 ).

Las ventajas de la prueba ELISA han influenciado a los investigadores para su adaptación al estudio de diferentes enfermedades, ya que es fácil de realizar, sensible, específica y se pueden procesar un buen número de muestras en forma rápida. Además, no necesita equipo sofisticado y se puede adaptar a condiciones de campo. Los reactivos son estables por largos períodos de tiempo ( 6, 33, 42, 43 ).

La prueba ELISA presenta aplicaciones, no solo en el campo de la investigación ( 26 ), y diagnóstico, sino también, en estudios seroepidemiológicos ( 44 ). La prueba ELISA ha sido empleada en endocrinología, hematología, inmunología, así como para el diagnóstico de enfermedades bacterianas, virales y parasitarias ( 43 ).

Con relación a las enfermedades parasitarias, la prueba ha sido empleada en el diagnóstico de Malaria ( 37 ) Amibiasis y Schistosomiasis ( 11 ) Onchocercosis ( 43 ) Toxoplasmosis ( 30 ) Hidatidosis, Tripanosomiasis ( 1 ) Triquinelosis ( 35 ) Babesiosis ( 33 ) y Fasciolosis ( 6 ).

\* ELISA son las siglas del nombre de la prueba en inglés, "Enzyme Linked Immunosorbent Assay".



El principio básico del método indirecto de la prueba -- ELISA es que un antígeno se adsorba a una superficie, pudiendo ser esta de diferentes materiales. Una dilución del suero problema es agregada y si contiene anticuerpos específicos, se unirán al antígeno, formándose un complejo antígeno-anticuerpo. Al agregar el conjugado marcado (anti-anticuerpo especie específico, con la enzima conjugada) se va a unir al complejo antígeno-anticuerpo, al cual se le agrega un sustrato para activar la enzima, produciendo un cambio de coloración. Se agrega una solución para detener la reacción. El color final, es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo desconocido. El resultado puede ser leído directamente por observación visual o con la utilización de un espectrofotómetro, para medir la densidad óptica de la reacción ( 6, 33, 42, 43 ).

Los objetivos del presente trabajo son el emplear el método indirecto de la prueba micro-ELISA para el diagnóstico de la Fasciolasis bovina y analizar la aplicación de ésta prueba en un estudio seroepidemiológico de Fasciolasis bovina, tanto de una zona templada como de una zona tropical húmeda.

## II. MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Parasitología del Centro Nacional de Parasitología Animal ( C. N.P.A.) del Fideicomiso Campaña Nacional contra la Garrapata, S.A.R.H., ubicado en el Rancho Pachita, Delegación Contreras, D.F. y en el laboratorio de Epidemiología del Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

### II. 1. Preparación de Antígenos.

Como una fase inicial de éste trabajo se obtuvieron tres antígenos somáticos de Fasciola hepatica adulta decomisados - de hígados afectados en el rastro de Ferrería, por medio de - técnicas diferentes:

#### II. 1. a) Antígeno A1 ( 6 ).

Los trematodos adultos fueron lavados con solución salina fisiológica (ssf) y posteriormente con agua destilada. Se congelaron. Se secaron con papel filtro y fueron molidos en - un mortero, hasta obtenerse un polvo fino. En 25 ml de solución amortiguadora (pbs) \* (pH 6.8), se disolvieron 0.5 g del polvo, agitándose en un rotor magnético por 30 minutos. La -- preparación se mantuvo a 4 C, durante 12 hs. Posteriormente, - se centrifugó a 5,000 revoluciones por minuto (rpm) durante - 45 minutos.

El sobrenadante se usó como antígeno, el cual se congeló

\* pbs, son las siglas en inglés para el Phosphate buffer sa  
line.

a -4 C hasta el momento de empleo.

II. 1. b) Antígeno A2 ( 31 ).

Los parásitos adultos fueron lavados en una solución de cloruro de sodio a 0.15 M y se congeló a -4 C por 24 hs. Después se descongelaron a temperatura ambiente y se procedió a homogenizarse empleando un mortero de tejidos Ten Broeck.

El homogenizado se mantuvo a 4 C por 24 hs. Las partículas grandes fueron sedimentadas por 10 minutos a 6,000 rpm a -4 C. El sobrenadante se centrifugó a 35,000 rpm ( 56,500 g ) por 45 minutos a 4 C y se obtuvieron 3 capas en el tubo. El sedimento compuesto por partículas finas, la capa media que fue usada como antígeno y la capa superficial que probablemente sea de origen lipídico. El antígeno se congeló a -4 C -- hasta su empleo.

II. 1. c) Antígeno A3 ( 25 ).

Las Fasciolas adultas se lavaron con ssf hasta que el sobrenadante se observó claro. Se realizó un nuevo lavado con -- agua destilada. Se congelaron a -4 C y se liofilizaron.

El liofilizado se molió en un mortero en baño de hielo. El polvo obtenido se desengrasó con acetona fría y se mantuvo 10 minutos en el congelador. Se lavó posteriormente con acetona a temperatura ambiente. El último lavado se hizo en caja de Petri con papel filtro en el fondo, dejándose evaporar la acetona a -- temperatura ambiente. Se pesaron 2 g del polvo y se suspendie--

ron en 20 ml de pbs (pH 6.8).

Posteriormente, se dejó la suspensión en agitación lenta con un rotor magnético por 12 hs, a temperatura ambiente y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos el sobrenadante se filtró con papel filtro (Whatman 1), congelándose a -4 C hasta su empleo.

La concentración apropiada de cada preparación antigénica se determinó por titulación en placa, usándose diferentes diluciones para establecer la concentración óptima y se les determinó la cantidad de proteína, por el método de Lowry -- ( 28 ).

#### 11. 2. Obtención de Sueros Testigo.

Los sueros testigo se obtuvieron de animales positivos y negativos a Fasciolasis por el método coproparasitoscópico de sedimentación y por la prueba de Inmunodifusión doble de Ouchterlony.

#### 11. 3. Procedimiento de micro-ELISA.

Se colocaron 50 microlitros de las diferentes diluciones de antígenos a las diluciones óptimas disueltas en amortiguador carbonato-bicarbonato (pH 9.5)\*, en cada una de las 96 - cavidades de la microplaca de poliestireno\*\*, dejándose durante 12 hs a 4 C para que se adsorba el antígeno a las paredes de los pozos de la microplaca.

\* Ver apéndice.

\*\* Dynatech Inc. Co. plato # M 129 A. Alexandria, Virginia.

Al día siguiente se lavaron las microplacas 3 veces con solución de lavado, ssf, conteniendo 0.5% de Tween 20.

Se colocó en cada serie de 8 cavidades 50 microlitros de las diluciones dobles seriadas de cada suero problema, iniciándose con la concentración de 1:25 y terminando con la dilución 1:3200, diluidos en amortiguador Tris, con albúmina sérica para reducir efectos no específicos ( 9 ), y se incubó a 37 C por una hora.

Nuevamente, se lavaron las cavidades 3 veces como previamente se mencionó.

Se colocaron 50 microlitros de conjugado anti-inmunoglobulina IgG bovina\* proveniente de una casa comercial, empleándose una dilución 1:500 ( 21 ) disuelta en amortiguador Tris. Se colocó en las cavidades de la microplaca y se incubó a 37-C por una hora.

Se lavó 3 veces la microplaca, de la misma manera antes-citada.

Se depositó en cada cavidad 100 microlitros de la solución sustrato (ABTS\*\*) y se incubó a 37 C por 10 a 15 minutos.

Para detener la reacción, se agregaron 100 microlitros de la solución de paro.

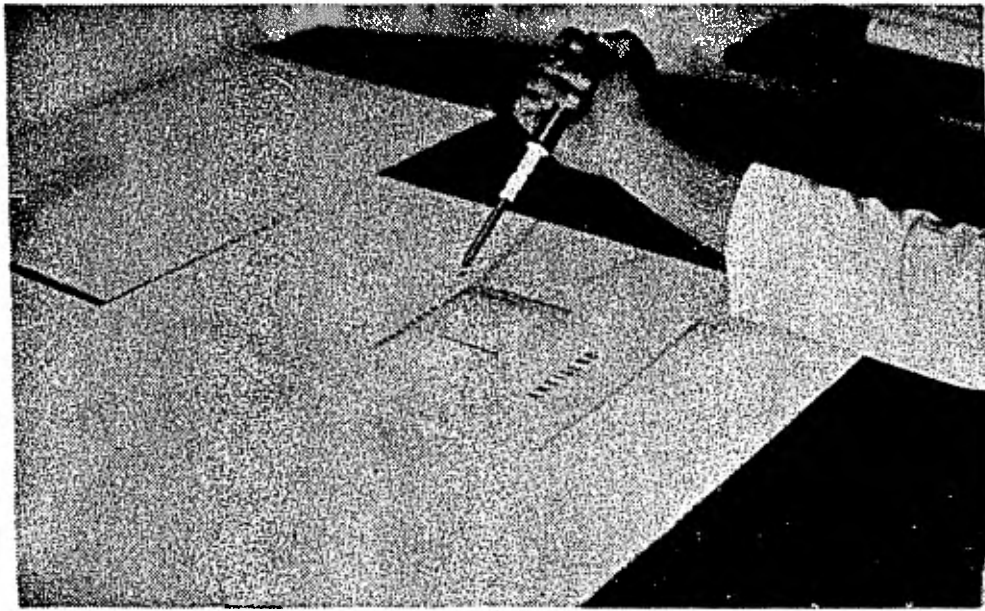
Se practicó la lectura por el cambio inmediato de coloración. El color del punto final de la dilución del suero pro--

\* Capel Laboratories.

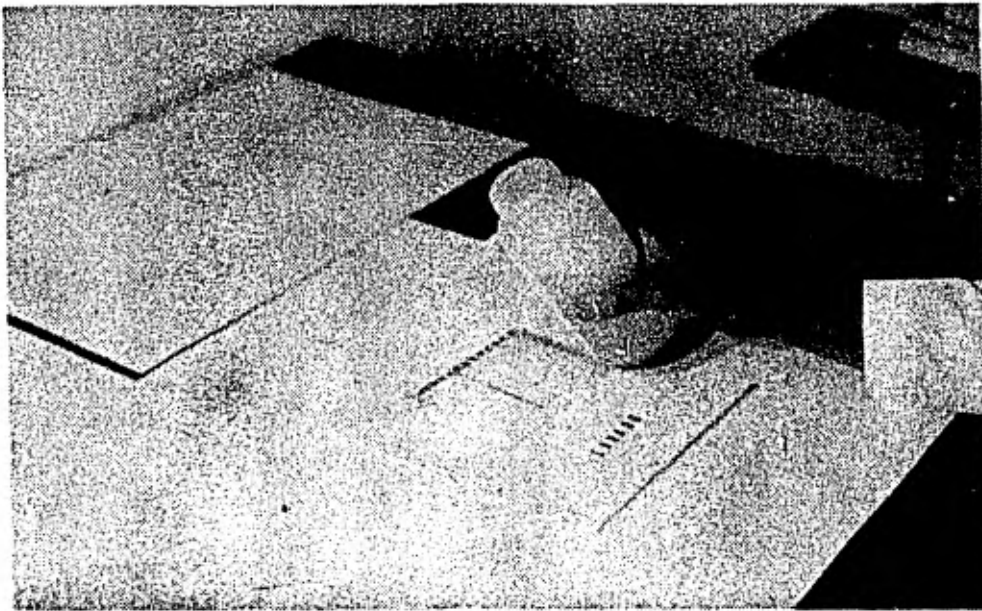
\*\* Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.

blema, se comparó con la coloración de los sueros testigos positivo y negativo.

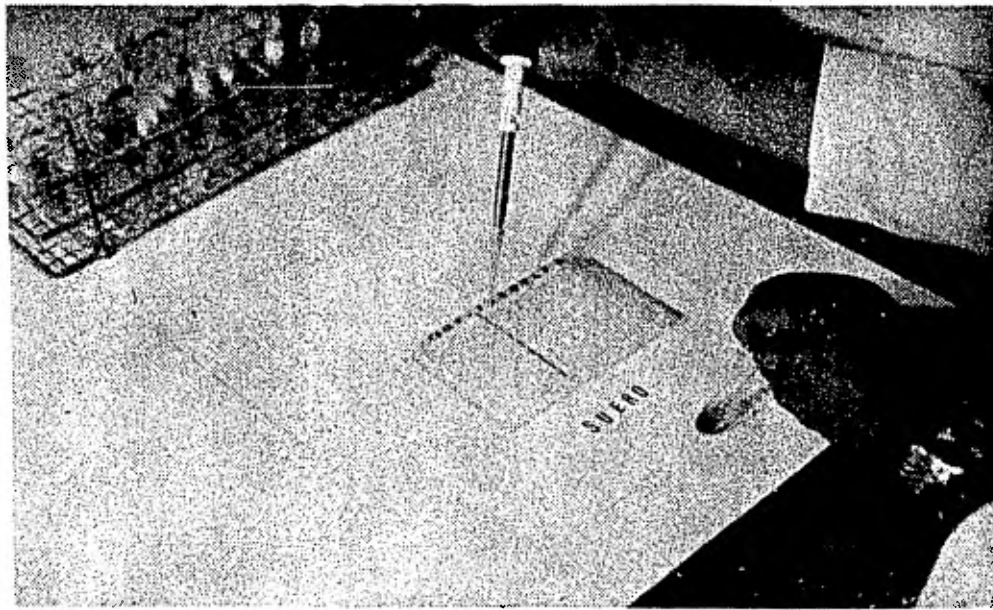
En todas las placas se tuvieron 4 columnas de cavidades - para el sustrato testigo (CS), en el cual se omite el paso de la adición del conjugado; el conjugado testigo (CC), en el -- cual se omite la adición del suero problema para verificar los cambios de la coloración de la solución de sustrato, o la ad-- sorción inespecffica del conjugado. Asimismo se dejaron 2 co-- lumnas con los sueros testigo positivo (+) y negativo (-) para comparar la reacción completa.



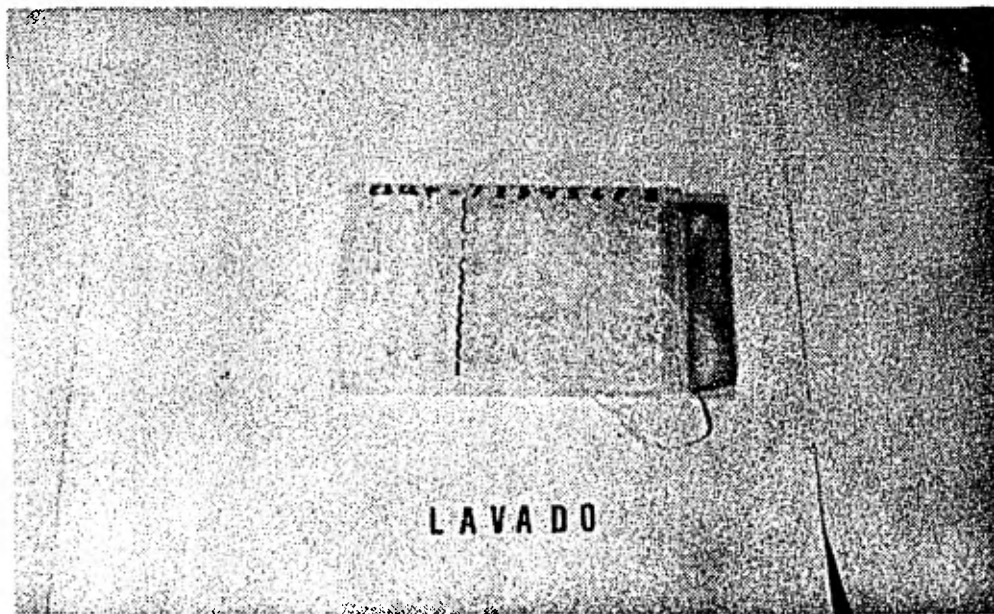
Fotografía 1. Adición del antígeno.



Fotografía 2. Lavado.

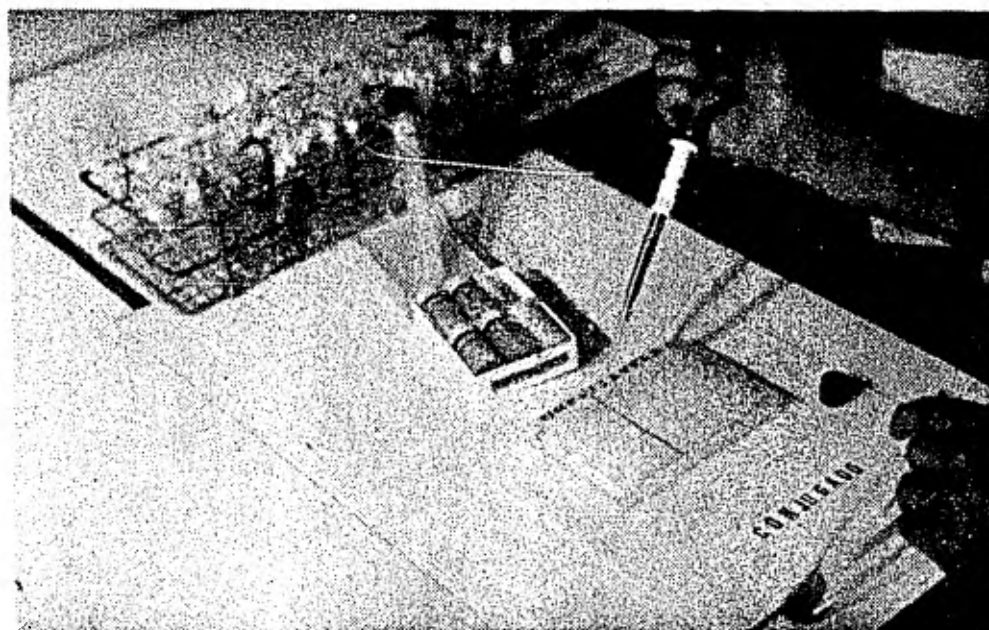


Fotografía 3. Se agrega el suero problema.

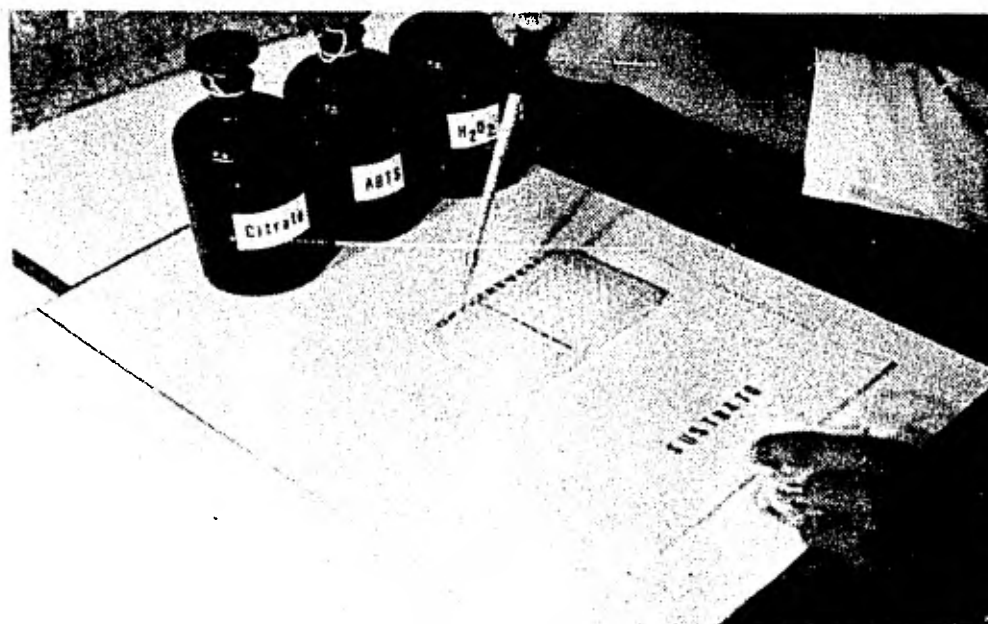


Fotografía 4. Lavado.

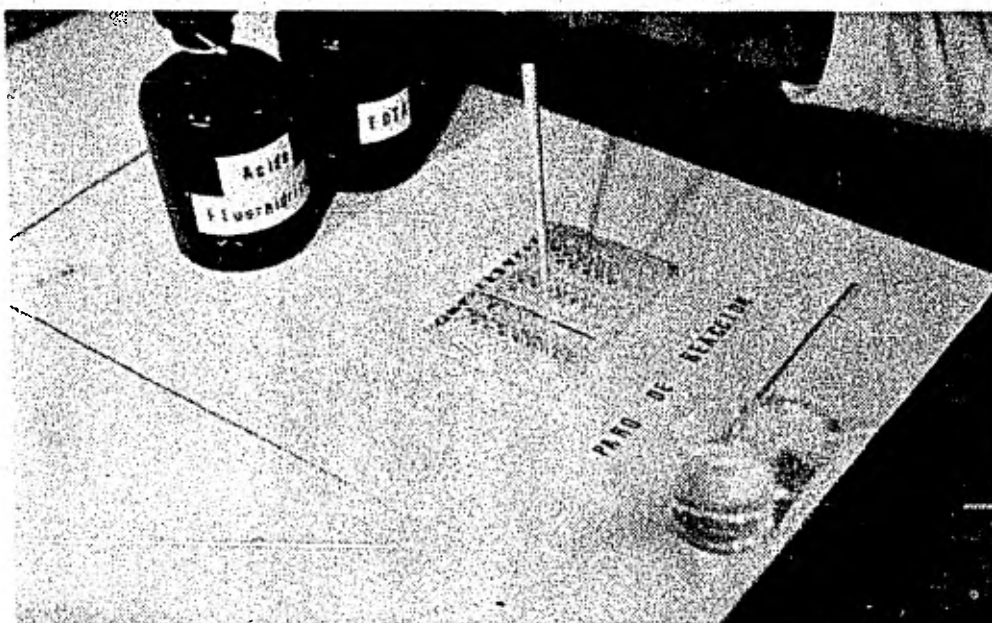




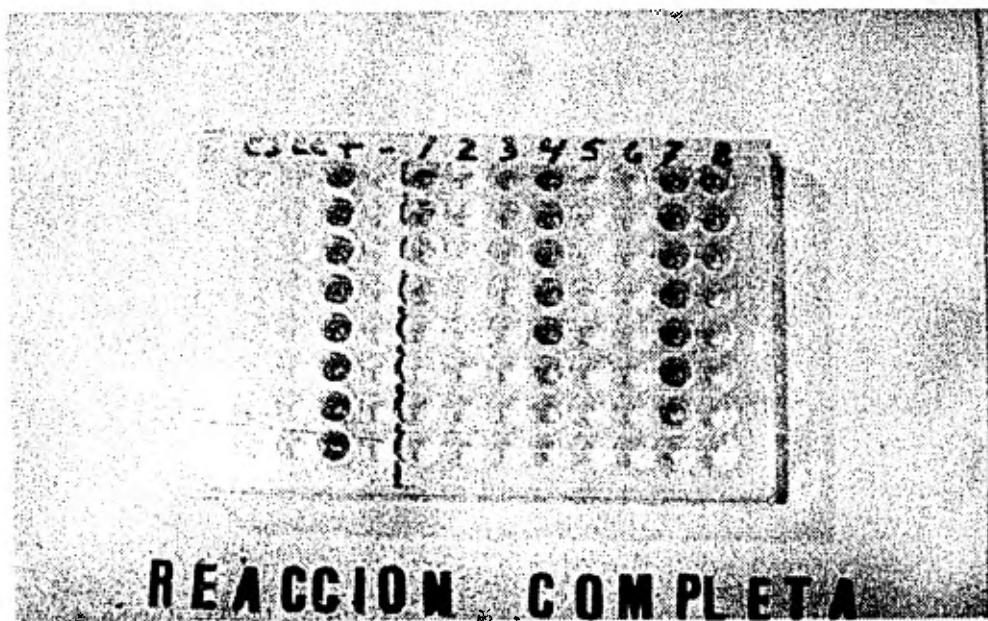
Fotografía 5. Se agrega una anti-inmunoglobulina I g G bovina.



Fotografía 6. Solución usada como sustrato.



Fotografía 7. Solución de paro.



Fotografía 8. Se realiza la lectura, comparando los testigos con el suero problema. En la columna 7, como -- ejemplo, la titulación es 1:1600.

#### 11. 4. Areas Muestreadas.

##### 11. 4. a) Zona templada:

El Municipio de Santa María Rayón, Edo. de Méx., donde se obtuvieron las muestras, se encuentra en una latitud norte de  $99^{\circ}27'$  y  $19^{\circ}11'$  de longitud oeste, a 2,630 m de altitud, con precipitación pluvial anual media de 1,035.5 mm, temperatura de 18.3 C y de 13.3 C en el mes mas caluroso (junio) y el mas frío (enero) respectivamente y con un promedio anual de 16.3 C. El tipo de suelo es arcilloso.

En los meses de septiembre y octubre de 1980 se tomaron muestras de sangre y heces fecales de 38 bovinos de diferentes propietarios. El ganado era de tipo lechero de la raza Holstein Friesian y cruza de ésta, con edades comprendidas entre 1 y 11 años. Los animales pastoreaban por las mañanas en el potrero comunal de la población el que presenta un canal de agua que corre lentamente, circundando al potrero y a los caminos que llevan a éste y que se conecta con aguas de otras poblaciones. El pasto no era muy abundante y el terreno se encontraba fangoso. Los propietarios no llevan a cabo programas de medicina preventiva y no cuentan con asistencia técnica.

Los sueros se examinaron por el método indirecto de micro-ELISA, utilizándose el antígeno 1 (A1) para la titulación de anticuerpos contra Fasciola hepatica; las heces fueron estudiadas por la técnica de sedimentación.

11.4.b) Zona de trópico húmedo.

En el Municipio de Hueytamalco, Puebla, a una altura de 350 m sobre el nivel del mar se localiza el Rancho La Carolina, de propiedad privada, a  $97^{\circ}27'$  de latitud norte y  $19^{\circ}57'$  de longitud oeste, con una precipitación pluvial media de 3,500 mm y temperatura media de 21.4 C, siendo la mas alta en el mes de junio de 25.4 C y la mas baja en enero de 16.8 C. El tipo de suelo es arcilloso pesado con diverso contenido en sales -- siendo rico en elementos como el calcio.

En este rancho, constantemente se hacen estudios coproparasitoscópicos (cps) para determinar la parasitosis del ganado; en cuanto al control de la Fasciolosis, practican la desparasitación del hato a la presencia de un solo animal positivo al examen cps. Asimismo, cada mes practican el baño garrapaticida, pesaje, vacunaciones correspondientes de acuerdo a la -- época y a lo determinado por su programa de medicina preventiva o por los registros llevados mediante tarjetas.

En el mes de diciembre de 1980 se tomaron muestras de -- sangre de 88 bovinos tomados al azar en dos potreros. El primero, con 55 novillos de engorda de 365 kg de peso promedio al momento de tomar la muestra, siendo animales cruzas de Charo--lais, Simmental, Pardo Suizo y Cebú, con edades que fluctuaban entre 18 y 22 meses. Se tomó muestras de excremento para hacer una mezcla de 10 excrementos.

El otro potrero, con 33 vacas cebú de 3 a 7 años de edad

de 550 kg de peso aproximados, en buen estado nutricional. Se tomaron varias muestras de excremento y se hizo una mezcla de 10 casos tomados al azar.

### III. RESULTADOS.

#### III. 1. Antígenos.

Los resultados de las diluciones de los 3 antígenos somáticos obtenidos de Fasciola hepatica y sus concentraciones óptimas de proteína, se indican en el cuadro 1. A partir de estos resultados se decidió utilizar el antígeno A1 para la realización de la prueba micro-ELISA para los estudios seroepidemiológicos de las áreas muestreadas.

Cuadro 1. Título y concentración proteica de los antígenos de Fasciola hepatica.

Antígeno No.	Título correspondiente a la dilución.	Concentración de proteína ( ng/0.5 ml )
A1	1:150	7.5
A2	1:800	12.5
A3	1:800	34.3

ng = nanogramos

VMTC  
VIII/80

III. 2. Prueba micro-ELISA en Santa María Rayón, Edo. de Méx.

En el cuadro 2, se pueden observar los resultados en términos de título de micro-ELISA y la técnica de sedimentación en cada uno de los 38 animales en estudio. Se indica también su edad y sexo.

De los 38 bovinos, 36 animales (94.7%) fueron positivos a micro-ELISA y 2 fueron negativos. Los resultados del examen -- coproparasitoscópico practicado en los mismos bovinos, mostraron que 17 de 38 fueron positivos (44.73%), en tanto que 21 (55.25%) fueron negativos.

En el resultado del título de anticuerpo por micro-ELISA, se puede notar que 24 de los 38 animales (83.32%) tuvieron títulos de 1:400 o menores lo cual indica una parasitosis alta. Esto es de esperarse dada las bajas condiciones sanitarias de la zona. Es interesante hacer notar que los 6 animales restantes positivos a micro-ELISA y a títulos mayores de 1:400 --- (cuadro 3) también lo fueron a la técnica de sedimentación, -- coincidiendo ambos resultados en una inminente presencia del - trematodo, manifiesta clínicamente en la pobre condición del - ganado y su baja producción.



Cuadro 2. Resultados de la prueba micro-ELISA y de los exámenes cps en los bovinos de Santa María Rayón.

No Indiv.	Sexo	Edad (Años)	Título - micro-ELISA	Sedimentación.
1	h	4	1:200	+
2	h	5	1:400	-
3	h	8	1:800	+
4	h	2	1:100	-
5	h	2	1:200	-
6	h	9	1:50	-
7	h	8	1:400	+
8	h	4	1:400	-
9	m	1	1:1600	+
10	h	8	1:400	-
11	h	2	1:100	-
12	h	11	1:100	-
13	h	6	1:1600	+
14	h	2	1:200	-
15	h	6	1:200	+
16	h	3	-	-
17	h	2	1:50	-
18	h	11	1:50	-
19	h	4	1:200	-
20	h	7	1:200	-
21	h	7	1:100	-
22	h	4	1:100	+

Cuadro 2. continua.

No Individ.	Sexo	Edad (Años)	Título - micro-ELISA	Sedimentación.
23	h	6	1:400	+
24	m	1	1:800	+
25	m	1	1:3200	+
26	h	3	1:3200	+
27	h	2	1:100	+
28	h	4	1:100	+
29	h	7	-	-
30	h	5	1:50	+
31	h	6	1:100	-
32	h	4	1:100	-
33	h	7	1:100	-
34	h	2	1:50	-
35	h	1	1:200	+
36	m	6	1:50	-
37	h	6	1:400	+
38	h	6	1:50	-

VMTC  
X / 80.

Cuadro 3. Titulación del total de bovinos positivos a micro-ELISA de Santa María Rayón.

TITULOS	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
BOVINOS	7	9	8	6	2	2	2

VMTC  
X / 80.

### III. 3. Prueba micro-ELISA en Hueytamalco, Puebla.

En el cuadro 4, se pueden observar los resultados en los sueros y materia fecal en los bovinos del Rancho La Carolina.

De los 88 animales 16 (18.18%) fueron positivos a la prueba de micro-ELISA y 72 fueron negativos. Con respecto a los exámenes coproparasitológicos practicados en los bovinos de esta zona se obtuvieron resultados negativos.

El resultado de la titulación de anticuerpos en los bovinos en la zona de Hueytamalco, dió titulaciones mas bajas de 1:400, siendo solamente 4 novillos problema del total de positivos, 2 con título de 1:50 de los 8 totales a esa dilución y 2 de 1:100 de los 5 animales correspondientes a esta dilución. Los otros bovinos positivos que faltan para completar el total (cuadro 5) fueron vacas y sus títulos de 1 : 200 para dos de ellas y un solo animal con 1:400, estos bovinos corresponden a animales mayores de edad y su permanencia en el hato podría indicar la presencia de un caso crónico a Fasciolasis.

Cuadro 4. Resultados de la prueba micro-ELISA y de los -- exámenes coproparasitoscópicos de los bovinos -- procedentes de Hueytamalco, Puebla.

Grupo (edad- meses)	No. de Animales	micro - ELISA				Sedimen- tación.
		Positivos		Negativos		
		# +	%	# -	%	
Novillos (18-22)	55	4	4.54	51	57.95	Negativo
Vacas (36-84)	33	12	13.63	21	23.86	Negativo
Total	88	16	18.18	72	81.81	Negativo

VMTC  
XII/80

Cuadro 5. Titulación del total de novillos y vacas positivos a micro-ELISA en Hueytamalco.

TITULOS	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
NOVILLOS	2	2	0	0	0	0	0
VACAS	6	3	2	1	0	0	0
TOTAL	8	5	2	1	0	0	0

VMTC

XII/80.

#### IV. DISCUSION.

Las tres preparaciones de antígeno a las diluciones indicadas en la titulación, dieron una reacción similar a la prueba micro-ELISA. Aunque la concentración de proteína fue mayor en los antígenos A2 y A3 en comparación con A1, por la facilidad de realización se consideró emplear el antígeno A1 en la realización de las pruebas; por otra parte, es difícil comparar la actividad de antígenos parasitarios empleados en pruebas inmunológicas ya que el comportamiento de los anticuerpos a los determinantes antigénicos puede variar con antígenos diferentes ( 23 ).

La naturaleza y fuente de los antígenos empleados contribuye significativamente a la especificidad y a la sensibilidad de las pruebas inmunológicas ( 8 ). Sin embargo, hay una gran dificultad de obtener antígenos purificados y específicos para ciertas enfermedades, especialmente las parasitarias producidas por helmintos. Esto se debe a que el mosaico antigénico es complejo y variable, ya sea por las estructuras del parásito -- como por los productos de su metabolismo ( 16, 40 ). Por lo -- tanto existe una gran cantidad de antígenos posibles en los -- helmintos, para tener una prueba inmunológica exacta en la determinación diagnóstica. Burden y col. (1979) emplearon diferentes antígenos con la prueba de ELISA, incluyendo los obtenidos de trematodos inmaduros y adultos, huevecillos de estos y productos del metabolismo. Estos autores encontraron resultados similares con las diferentes preparaciones antigénicas y -

comprobaron, en animales libres del parásito que alguno de los componentes del antígeno crudo en la prueba de ELISA reaccionaban inespecíficamente ( 7 ). Por esta razón se consideró a la reacción 1:25 como negativa, a semejanza con otros trabajos en parásitos como son Toxoplasma gondii y Triquinella spiralis -- ( 30, 35 ).

La sensibilidad y especificidad de todas las pruebas diseñadas para detectar anticuerpos específicos se debe a la cantidad y calidad de los antígenos ( 1 ).

La prueba micro-ELISA presenta una alta sensibilidad y -- especificidad ( 34, 36, 45 ); sin embargo, el empleo de cantidad insuficiente de antígeno para adsorberse puede dar respuestas falsas positivas; asimismo, las preparaciones crudas - aumentan la posibilidad de reacciones cruzadas, dándonos falsos positivos e influyendo en la sensibilidad de la prueba ( 1 ).

La prueba se realizó en la microplaca de poliestireno según lo sugiere Ruitenberg y col ( 35 ) y Bullock y col ( 5 ) - como la mas adecuada para la adsorción del antígeno. El sustrato ABTS empleado en la prueba, es considerado por Saunders -- ( 36 ) como el mas sensible y estable, que se puede adquirir - comercialmente, en su forma pura. Este sustrato da un cambio - de color a la reacción antígeno-anticuerpo-conjugado ( 43 ) de terminado por un punto final colorimétrico que es leído vi-- sualmente. Cuando no se cuenta con un aparato espectrofotomé-- trico especial para micro-ELISA, dicha medición, aunque adecua



da ( 45 ) está sujeta a la tendencia del observador. La lectura correcta es la dada por un espectrofotómetro donde se cuantifica numericamente, dando rangos de distribución para determinar el suero positivo y el suero negativo ( 20 ); es decir, determinar el grado de absorbancia para el suero positivo y negativo - ( 36 ). Los tiempos de incubación empleados correspondieron a los señalados por Hillyer y col ( 21 ) y Bidwell y col ( 3 ) entre otros.

Se eligieron, para la obtención de las muestras de sueros, la zona templada de Santa María Rayón, Edo. de Méx. y la zona tropical húmeda de Hueytamalco, Puebla. Ambas tienen características apropiadas para el desarrollo del huésped intermediario de Fasciola hepatica, particularmente un gasterópodo pulmonado del género Lymnaea, que necesita un rango de temperatura de 9 a 27 C y un habitat humedo.

En México ( 39 ) han sido encontrados L. bulimoides en Hidalgo; L. humilis en Hidalgo, Puebla, Durango y Sonora; L. cubensis, en Hidalgo, Puebla, Veracruz y Edo. de Méx.; L. obrussa en Durango; L. columella, en Puebla, y L. attenuata, presente en casi toda la República.

En la zona templada de Santa María Rayón el manejo del ganado es deficiente y la mala condición de los animales, se refleja en la baja producción de leche y de ganancia de peso. Se encontró un total de 36 animales positivos ( 94.7% ) de 38 muestreados con la prueba de micro-ELISA. En los exámenes cps -

practicados en cada uno de los mismos animales, solo 17 (44.73%) fueron positivos. En la otra zona muestreada, en Hueytamalco, -- Puebla, se encontró de un total de 88 animales a 16 positivos -- ( 18.18% ) usando micro-ELISA siendo negativa en los mismos animales las pruebas cps a Fasciolasis. Los animales en esta zona - están sujetos a un manejo adecuado y se encontraron en condiciones satisfactorias. Los conocimientos de las personas encargadas hacen posible controlar la Fasciolasis, la cual estuvo presente en el año de 1979, a partir de entonces realizan desparasitación de todo el hato, a la presencia de un solo animal positivo al -- cps, evitando con esta medida la aceleración del ciclo parasitario, interrumpiendo la diseminación de huevecillos y eliminando el trematodo de los animales preservando su potencial económico ( 2 ). El rancho estudiado no es representativo de la zona, donde la mayoría de las explotaciones tienen características sanitarias deficientes y donde el problema de la Fasciolasis puede ser grave.

El estudio coproparasitoscópico no resulta tan específico - como la técnica de micro-ELISA, debido a la intermitencia de la postura de huevecillos de Fasciola y la expulsión de ellos por - las contracciones de la vesícula biliar. Aunque la inmunidad humoral no es determinante en la resistencia al parásito la presencia de anticuerpos es de gran utilidad al diagnóstico. Los bovinos son mas resistentes que otros animales a una infestación por Fasciola hepatica debido a la distribución y cantidad de tejido conjuntivo en el parenquima hepático, aunque la susceptibilidad es variable ( 38 ). La susceptibilidad es menor a medida que las

reinfestaciones se suceden, expulsándose los trematodos entre los 3 y 9 meses después de la infestación sobreviviendo unos cuantos por período mas largo. El rechazo aparente es debido a la reacción epitelial de los conductos biliares con infiltración fibrosa y calcárea, que impide la nutrición de los parásitos. En el caso de formas inmaduras, existe cierta inmunidad contra la reinfestación en las 12 semanas posteriores a la primera infección, siendo destruidas en el parénquima hepático.-- La metacercaria penetra a la luz del intestino y a la cápsula del hígado, gracias a secreciones enzimáticas que son inmunogénicas; en animales sometidos a reinfestación estas formas inmaduras no logran penetrar al hígado ( 2 ).

Se indica la evidencia de anticuerpos específicos a Fasciola hepatica consecutivos a la infestación y un incremento en -- las globulinas séricas, al llegar el trematodo al hígado ( 8 ); Se considera que la ausencia de huevecillos en las heces no indica que el animal no esté parasitado ( 2 ); es decir, la presencia de falsos negativos demostrado en la diferencia de porcentajes en cuanto a la presencia de anticuerpos y de huevecillos en heces, hace estimar que la prueba micro-ELISA tiene una especificidad conveniente.

En el caso de pruebas serológicas, la interpretación de -- las titulaciones altas es debida a la infestación existente, a la sensibilidad de la prueba y al uso de antígenos crudos (27); las titulaciones bajas son debidas a infestaciones recientes o a casos crónicos y las medias son causadas por casos en regre--

sión o en desarrollo; además, pueden influir en los resultados de la prueba, factores relacionados con el operador.

Las titulaciones altas se encontraron en los animales procedentes del Municipio de Santa Marfa Rayón que mostraron visible retraso en el crecimiento y positividad al cps. Asimismo - se observaron diferencias en los animales de acuerdo a las edades. Estas diferencias no pueden ser analizadas debido a que - el número de animales estudiados a las diferentes edades no -- fueron uniformes. Es importante mencionar que se pretendía es- tudiar la prueba de micro-ELISA y que la planeación de traba-- jos epidemiológicos requiere de un apoyo muestral estadístico. Los dos animales negativos a micro-ELISA también lo fueron al examen cps y fueron bovinos recientemente introducidos en el - potrero.

En Hueytamalco, 4 novillos de los 55 muestreados fueron - positivos a la prueba micro-ELISA, aunque a títulos bajos. Es- tos animales tuvieron un peso al nacer y al destete inferior - al promedio del hato lo cual puede indicarnos un menor desarro- llo y por lo tanto una mayor susceptibilidad. Las madres de -- estos novillos habían sido desechadas del hato por baja pro-- ducción.

El título mayor en esta zona fue en una vaca, lo cual puede indicar que su permanencia en el hato, le hace parecer como un caso crónico. En general los títulos que se obtuvieron en - Hueytamalco son bajos, probablemente debido al estado de regre- sión del sistema inmunocompetente después de la infestación de

1979. Además, el cps fue negativo en contra de lo que se pudiera esperar en la zona. De aquí se infiere que la parasitosis fue eliminada debido a las medidas de control por su programa de medicina preventiva.

En los animales de la zona templada, los títulos fueron altos probablemente debido a la continua exposición al parásito, propiciada por deficiencias técnicas, culturales y económicas, que no permiten el control de la Fasciolosis.

Es necesario, para dar mayor confiabilidad a los resultados de los estudios seroepidemiológicos, un programa de muestreo de los mismos animales en las diferentes épocas del año, debido a que la influencia de diversos factores sobre el parásito y el huésped hacen variar su interrelación. Experimentos controlados de infestación en animales sanos pueden indicar con mayor exactitud los títulos a considerarse como positivos y las curvas de reducción de títulos en animales curados. Asimismo, es necesario determinar con precisión la sensibilidad y especificidad de esta prueba de selección, siguiendo los animales tanto positivos como negativos hasta el rastro, para confirmar la detección o no, con el examen post-mortem. Esto permitiría conocer mejor la historia natural de la enfermedad en estas zonas y determinar, las medidas de prevención y control a cumplirse.

## V. CONCLUSIONES.

1. La prueba micro-ELISA fue satisfactoria para detectar la presencia de anticuerpos contra Fasciola hepatica.
2. La prueba presenta ventajas como su fácil realización cuando se cuenta con el material adecuado. Los reactivos son estables por largo tiempo, pudiendose adaptar para manejar un gran número de muestras en forma rápida por automatización y uso de algunos aparatos.
3. Su uso en México puede dedicarse no solo al diagnóstico e investigación, sino también, como herramienta para estudios epidemiológicos en diferentes regiones de la República Mexicana. También podría utilizarse para otras enfermedades.
4. En la comparación de los dos lugares estudiados, el factor determinante para la presencia de Fasciolasis en bovinos, fue el programa sanitario o de medicina preventiva llevado a cabo.

VI BIBLIOGRAFIA.

1. Anthony, R.L., Johnson, C.M., Sousa, O.E.: Use of micro-ELISA for quantitating antibody to Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. J. Trop. Med. Hyg., 28 (6): 969-973 (1979).
2. Anónimo: La Fasciolasis en México. Merck Sharp and Dohme de México, 1980.
3. Bidwell, D.E., Bartlett, A., Voller, A.: Enzyme Immunoassays for viral diseases. The J. of Infec. Diseases, 136 - supplement Oct., 274-278. (1977).
4. Blood, D.C., Henderson, J.A.: Medicina Veterinaria, 4a. Edición, Editorial Interamericana, México. 631, 1976.
5. Bullock, S.L., Walls, K.W.: Evaluation of some parameter of the Enzyme - Linked Immunospecific Assay. The J. of Infec. Diseases, 136 Supplement Oct.: 279-285 (1977).
6. Burden, D.J., Hammet, N.C.: Microplate Enzyme Linked Immunosorbent Assay for antibody to Fasciola hepatica in cattle. Vet Rec., 103: 158-159 (1978).
7. Burden, D.J. Hammet, N.C.: The ELISA Test for detection of Fasciola hepatica infection in cattle. Exp. Parasit., 79 -- xIvi (1979).
8. Cohen, S., Sadun, H.: Immunology of Parasitic Infections. - Blackwell Scientific Publications. Osney Mead Oxford, 1976.
9. Crowther, J.R., Abu-El-Zein, E.M.E.: Detection and quantification of Foot and Mouth Disease virus by Enzyme Labelled - Immunosorbent Assay techniques J. Gen Virology, 42:597-602-

(1979).

10. Dargie, J.D., Armour, B.: Immune mechanisms and hepatic fibrosis in Fasciolasis, En 38. 1974.
11. Deelder, A.M., Ruitenberg, E.J., Kornelis, D., Staerenberg, P.A.: Schistosoma Mansoni: comparison of the Immunoperoxidase Techniques Dass and ELISA for human diagnosis. Ex. Parasit., 41: 133-140 (1977).
12. Dinneen, J.K., Kelly, J.D., Campbell, M.J.: Further observations of the nature and characteristics of cross protection against Fasciola hepatica produced in sheep by infection -- with Cysticercus tenuicollis. Intern. Society for Parasit. - 8: 173-176 (1978).
13. Engvall, E., Perlmann.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, - ELISA. III. Quantification of specific antibodies by enzyme labeled anti immunoglobulin in antigen coated tubes. J. -- Immunol., 109: 129 (1972).
14. Escartín, M.: Estudio Epizootiológico de la Fasciolasis en el ganado bovino lechero en el Municipio de Tulancingo, Hidalgo. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1970.
15. Escudero, J.E., López, E.G., Montes de Oca, J., Trejo, L.C., Flores R.C.: Ecología de hospederos intermediarios de Fasciola hepatica. Curso de Actualización de Enf. Parasitarias del Ganado Bovino. Div. Estudios de Postgrado. Fac. Med. Vet. -- Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.,



1978.

16. Fudenberg, H.H., Stitles, D.P., Caldwell, J.L., Wells, J. - V.: Manual de Inmunología Clínica. Editorial Manual Moderno, México, D.F. 657-658, 1978.
17. Gómez F.F.: Valoración de la intradernorreacción en el diagnóstico de la Fasciolosis bovina. Tesis de licenciatura. -- Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1970.
18. González H.A.: Pérdidas económicas por el decomiso total o parcial de hígados de bovinos parasitados con Fasciola hepática. Tesis de licenciatura Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1969.
19. Harrison, T.R., Isselbacher, K.J., Adams R.D., Braunwald -- E., Petersdorf, R.G., Wilson, J.D.: Principles of Internal - Medicine. Mc. Graw Hill-Book Company. 9th Edition. New York. 973.1980.
20. Heck, F.C., Williams, J.D., Pruett, J.: Interpretation of - spectrophotometric absorbance values to define results of - Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J. of Clinical Microb., Apr: 398-401 (1980).
21. Hillier, G.V., Santiago, N.W.: Use of Immunologic Techniques to detect chemotherapeutic success in infection with Fasciola hepática II. The Enzyme linked Immunosorbent Assay in -- infected rats and rabbits. J. of Parasitol. 65 (5): 680-684 (1979).

22. Hillyer, G.V., Ahain, D.: Use of Immunologic Techniques -- to detect chemotherapeutic success in infection with Fasciola hepatica III. Comparison of Counterelectrophoresis and Indirect Hemoagglutination in infected rabbits. J. of Parasitol, 65 (6): 960-963 (1979).
23. Hillyer, F.V., Sagramoso, LA.: Antibody responses in murine Schistosomiasis and Fasciolasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (4): 598-601 (1980).
24. Howell, M.J. Sandeman, R.M., Rajasekariah, F.R.: In vivo and In vitro studies of the effects of immune rat serum on Fasciola hepatica. International J. for Parasitol., 7:367-371 (1977).
25. I.N.I.P.: Manual de Laboratorio, Curso de Actualización de Inmunología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de la S.A.R.H., 1979.
26. Leinikki, P.O., Passila, S.: Quantitative semiautomated -- Enzyme-Linked-Immunesorbent Assays for viral antibodies. - The J. of Infect. Diseases, 136 Supplement, oct. 266-273 - (1977).
27. Levine, D.M., Hillyer, F.V., Flores, S.: Comparison of -- Counterelectrophoresis, The Enzyme-Linked Immunesorbent -- Assay and rats fecal examination for the diagnosis of Fasciolasis in infected mice and rabbits. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (4): 602-608 (1980).

28. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951).
29. Mazzotti, L., Ruiz Soto, R., Ramirez, J.: Estudios sobre Fasciola hepatica. Rev. del Inst. Salubr. y Enf. Trop., -- 16: 27-29 (1956).
30. Mineo, J.R., Camargo, M.E., Ferreira, A.W.: Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay for antibodies to Toxoplasma gondii -- polysaccharides in human Toxoplasmosis. Infect. and Immunity., 27 (2): 283-287 (1980).
31. Moosyen, M.O., Borojevic, D.: Antigenic Analysis of Fasciola hepatica: Extraction and Fractionation. En Isotopes -- and Radiation in Parasitology III. International Atomic Energy Agency, FAO., Viena., 1973.
32. Muñoz, R.A. Estudio epizootiológico de la Fasciolosis por-Immuno-reacción en bovinos en el Valle Morelia-Querétaro.- Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad-Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1970.
33. Purnell, R.E., Bidwell, H.D.J., Turp, P.: Microplate Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay for antibody to Babesia divergens in cattle. Vet. Rec., 99: 102 (1976).
34. Richardson, L.S., Yolken, R.H., Belsche, R.B., Camargo, E., Kim, H.W., Chanock, R.M.: Enzyme-Linked-Immunosorbent -- Assay for measurement of serological response to Respirato ry Syncytial virus infection. Infect. and Immunity., 20 --

- (3): 660-664 (1978).
35. Ruitenberg, E.J., Buys.: Trichinella spiralis infections - in pigs. Comparison of Homologous Passive Cutaneous anaphylactic (PCA) Reactions with the Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA). Vet. Parasit., 5 73-78 (1979).
  36. Saunders, G.C., Clinard, E.H., Bartlett, M.L., Saunders, W.M.: Application of the Indirect Enzyme-Labelled antibody Microtest to the detection and surveillance of animal disease. J. of Infect. Diseases., 136, Supplement Oct. 258--266 (1977).
  37. Spencer, H.C., Collins, W.E., Chim W., Skinner, J.C.: the Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) for Malaria I, - the use of in vitro-cultured Plasmodium falciparum as antigen. J. Trop Med. Hyg., 28 (6): 927-932 (1979).
  38. Soulsby, E.J.L.: Parasitic Zoonoses, Clinical and Experimental Studies. Academic Press Inc. New York, E.U.A. 1974.
  39. Trejo, L.C.: Estudio de gasterópodos pulmonados dulceacuícolas, identificación e importancia en el ciclo biológico de Fasciola hepatica en el Estado de Puebla. IV. Congreso-Nal. de Parasit. Humana, México, D.F., 1980.
  40. Tizard I.R.: Inmunología Veterinaria, Editorial Interamericana, 1a. Edición. México, D.F. 1979.
  41. Uribe Aceves, R.A.: Epizootiología de la Fasciola hepatica en ganado bovino en el región de la Laguna de Zacoalco, -- Jalisco. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Uni

- versidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1974.
42. Voller, A., Bidwell, D.E., Barlett, A.: Enzyme immunoassays in diagnostic Medicine. Bull, World. Health Org. 53: 55-65- (1976).
  43. Voller, A., Bidwell, D.E., Barlett, A.: The Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA). Dynatech Laboratories, Inc. -- (1976).
  44. Willeberg, P.W., Ruppaner, R., Behymer, D.E., Higall, H., Franti, C.E., Thompson, R.A., Bohannan, B.: Epidemiological Survey of Sylvatic Plague by serotesting coyote sentinels - with Enzyme Immunoassays. Am. J. of Epidemiol. 110 (3): 328 -334 (1979).
  45. Yolken, R.H., Kim, H.W., Clem, T.: Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of human reovirus like -- agent of infantile gastroenteritis. The Lancet. Aug. 6; 263 -267 (1977).

## VII. Apéndice.

### Preparación de reactivos de ELISA.

#### Amortiguador carbonato-bicarbonato, pH 9.5

1. Preparar 0.1 M solución base de carbonato de sodio -----  
( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) pH 11.2 como sigue:
  - a) Agregar 10.6 gramos de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a un matraz.
  - b) Decantar a un litro de agua destilada.
  
2. Preparar 0.1 M de la solución base de bicarbonato de sodio  
( $\text{NaHCO}_3$ ) pH 8.1 como sigue:
  - a) Agregar 8.4 gramos de  $\text{NaHCO}_3$  a un matraz.
  - b) Decantar a un litro de agua destilada.
  
3. Agregar 13 partes de la solución base 0.1 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y --  
40 partes de la solución base 0.1 M de  $\text{NaHCO}_3$ ; diluirse --  
1:10 en agua destilada.

#### Amortiguador Tris.

1. Solubilizar los siguientes reactivos en 850 ml de agua des-  
tilada con un rotor magnético.  
8.7 gramos Na cl -- cloruro de sodio  
0.372 gramos EDTA -- etilen-diamino-tetracético-di sódico.  
6.05 gramos Tris base -- hidroximetil-amino-metano.  
0.2 gramos deazida de sodio --
  
2. Ajustar a pH 7.4 con ácido clorhídrico concentrado, llevar-  
se a un litro de agua destilada. Cuidadosamente llene la--

superficie con 1 gramo de albumina sérica bovina y dejelo - inmóvil por 15 minutos. Disuélvase lentamente en un rotor - magnético. Agregue finalmente 0.5 ml de tween 20.

#### Solución de lavado.

Disuelva 8.5 gramos de cloruro de sodio (NaCl) a 1 litro de agua destilada y agregue 0.5 ml de tween 20.

#### Sustrato.

1. ABTS 40 nM 2,2'-azino-di(ácido 3-etil-bentiazalin-sulfónico) solución base:
  - a) Agregue 274.4 mg de ABTS en un matraz.
  - b) Decantar a 12.5 ml de agua destilada.
  - c) Almacenarse a 4 C (pH aproximado de 6).
  
2. 0.5 M de Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) solución base:
  - a) Poner 0.5 ml de una solución 8 M de peróxido de hidrógeno (solución 30%) en una botella.
  - b) Agregue 7.5 ml de agua destilada.
  - c) Almacene a 4 C.
  
3. 0.05 M citrato pH 5 de solución base:
  - a) Agregue 9.6 gramos de ácido cítrico a un matraz.
  - b) Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar a pH 4 con 1M de hidróxido de sodio (NaOH) y llevarse a un volumen - de un litro.

4. La solución que se usará en la técnica realizada al momento de uso.

Agregar en un vaso de precipitados:

- a) 0.025 ml de ABTS, solución base.
- b) 0.02 ml de peróxido de hidrógeno, solución base.
- c) 5 ml de la solución base del amortiguador citrato.

Reactivo de paro de reacción.

1. 800 ml de 28.8M de ácido fluorhídrico; ajustarlo a pH 3.3 - con solución 1M de NaOH y llevarse a 1 litro.
2. 0.001 M de EDTA 0.29 gramos disolverlo en 1 litro de agua - destilada.
3. Solución que se realizó al momento de uso: agregar 0.1 ml - de EDTA a 100 ml de ácido fluorhídrico.