



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE
DIFERENTES PRUEBAS SEROLOGICAS
PARA EL DIAGNOSTICO DE
FASCIOLASIS EN OVINOS

T E S I S

Que para obtener el Título de
Medico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

Enrique Garay Garzón

Asesores M. V. Z. Carlos Ramón Bautista Garfias
M. V. Z. Antonio Acevedo Hernández



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.

I N D I C E

	PAGINA
I RESUMEN.	1
II INTRODUCCION.	2-8
HIPOTESIS.	9-10
OBJETIVOS.	11
III MATERIAL Y METODOS.	12-35
IV RESULTADOS.	36-49
V DISCUSION.	50-55
VI CONCLUSIONES.	56
VII LITERATURA CITADA.	57-61

R E S U M E N

ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE DIFERENTES PRUEBAS
SEROLOGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE
FASCIOLASIS EN OVINOS

Se obtuvieron 100 muestras de suero de borrego, en un período de tres meses del rastro de San Felipe del Progreso, Estado de México; y 15 sueros de ovino libres de Fasciola hepatica, del Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco, Puebla. A todos los animales se les hizo un estudio post-mortem, para verificar la presencia de Fasciola hepatica en los conductos biliares y se obtuvo una muestra de bilis que se observó en un microscopio estereoscópico, para verificar la presencia de huevecillos del tremátodo. Se preparó un antígeno somático de fasciolas de bovino, así como un suero hiperinmune en conejo, para correr las diferentes pruebas.

De los 100 sueros del rastro corridos, con la prueba de doble difusión en gel (DD), se obtuvo una sensibilidad del 23.68% y una especificidad del 85.48%; en la técnica de contrainmunolectroforesis (CIE) resultó una sensibilidad del 55.26% y una especificidad del 58.06%. La técnica de inmunoensayo en capa delgada, (ICD) fue la que dio mejores resultados del 83.87%, la hemaglutinación pasiva (HP) tuvo una sensibilidad del 28.94% y una especificidad del 91.93%.

Se sugiere utilizar una combinación de las técnicas de ICD y HP, para el diagnóstico de hato de fasciolosis en ovinos.

I N T R O D U C C I O N

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria principalmente de los rumiantes, debida a la presencia y acción de Fasciola hepatica en el parénquima hepático y conductos biliares. Por lo regular, es un proceso crónico que causa trastornos digestivos y de la nutrición (19), que provoca severas pérdidas, principalmente debido a muertes, retardo en la ganancia de peso, baja producción de leche y baja calidad de la lana, -- entre otras (1).

En nuestro país existen grandes pérdidas económicas a causa de la infección por Fasciola hepatica en los rumiantes, sin embargo, sólo se dispone de información limitada acerca de dichas pérdidas a nivel nacional. Según datos obtenidos por la Dirección General de Sanidad Animal a través de la Oficina de Análisis Epizootiológicos de la Subdirección de Epizootiología en ovinos, en el año de 1980, hubo una morbilidad por fasciolosis del 26.7% con una pérdida de 104.1 millones de pesos. La mortalidad, por otro lado, fue del 0.7% con -- una pérdida de 57.5 millones de pesos. Por concepto de pérdidas indirectas que comprenden: tratamientos, depreciación de instalaciones y pérdidas por concepto de mano de obra, se obtuvo una suma de 220 millones de pesos que, aunado a las -

pérdidas de morbilidad y mortalidad, hacen un total de 381.6 millones de pesos (4).

Con los datos anteriores, podemos decir que la fasciolosis - de los ovinos continúa siendo un grave problema para la ganadería del país.

Por otro lado, el examen coproparasitoscópico es la técnica que con mayor frecuencia es utilizada para el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos y ovinos, debido a que es sencilla y económica (24).

El método de sedimentación no es el más óptimo para determinar si el animal está libre de fasciola, ya que pueden obtenerse resultados falsos negativos cuando se hace el análisis de las heces una sola vez, requiriéndose hasta ocho sedimentaciones para determinar si el animal está libre de Fasciola hepática (5,8).

Durante su migración en el hígado de su hospedador, la Fasciola hepática, provoca una serie de cambios patológicos e inmunológicos. En estudios recientes se determinaron las clases de Inmunoglobulinas presentes en el suero de ovinos infectados con Fasciola hepática y se correlacionaron los niveles de anticuerpos en el curso de la infección. Los resultados que obtuvieron con la técnica de Hemaglutinación Pasiva indican que los niveles de anticuerpos al inicio de la infección se -

incrementaban, y después decrecían notablemente. Esto lo atribuyeron a que el tegumento de las fases migratorias estaba expuesto permanentemente al sistema inmune del huésped, lo que provocaría una fuerte respuesta inmunológica y una vez que los parásitos abandonaran el parénquima la estimulación antigénica del huésped sería nula. Las IgM fueron las inmunoglobulinas predominantes, mostrando sus máximos títulos entre la 7a. y 10a. semana, mientras que las IgG alcanzaron sus máximos niveles entre la 7a. y 14a. semana. Estos resultados parecen seguir el modelo clásico de la respuesta inmune con una producción inicial de la IgM seguida por la IgG (16, 17, 21).

Los resultados de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta muestran una intensa actividad de la clase IgG a partir de la 3a., semana correspondiendo con el período de migración de los parásitos en el parénquima hepático; el máximo título se registro a la 10a. semana, lo que corresponde a las fases tempranas del período patente de la infección (16, 17, 21).

Se desconoce si la disminución del estímulo al sistema inmune juega un papel importante en la falta de una respuesta protectora a Fasciola hepatica en ovinos, así mismo, se ha observado que existe poca o nula resistencia contra el parásito en esta especie (16, 17, 18, 22).

El estudio de estas alteraciones, puede conducir al mejor entendimiento de la enfermedad, de tal manera que puede ayudar

a establecer un mejor diagnóstico (23).

Es de suma importancia determinar cuál o cuáles antígenos son relevantes para diagnosticar una enfermedad o producir un inmunógeno, (1, 2): La estructura anatómica de los organismos patógenos se torna más compleja conforme se avanza en la escala filogenética y puesto que Fasciola hepática es un metazoario, el número de antígenos que posee es muy grande y a la vez estos antígenos son diferentes entre sí, por lo tanto, Fasciola hepática representa un "mosaico antigénico" con alto grado de complejidad. Básicamente los antígenos de Fasciola hepática pueden diferenciarse en dos grupos:

- a) Antígenos somáticos, que se obtienen de la integridad anatómica de los parásitos, y b) Antígenos metabólicos o productos de excreción y/o secreción de los parásitos mantenidos in vitro (1, 9). Existen varios trabajos sobre la obtención de antígenos de Fasciola hepática, así, en uno de los trabajos pioneros se analizó por medio de las técnicas de electroforesis e inmuno-electroforesis, un extracto salino deslipidizado de Fasciolas adultas y señalaron la existencia de 7 fracciones protéicas, 2 glucoproteínas y 6 lipoproteínas; de las cuales, 5 fueron específicas a Fasciola hepática y el resto dieron reacciones cruzadas con suero de animales parasitados con otros helmintos (3).

Otros investigadores han observado que, los antígenos metabólicos de Fasciola hepática, poseen un menor número de componentes antigénicos (11).

Al filtrar un extracto salino de fasciolas adultas con - - - sephadex G-200, otros autores obtuvieron 4 fracciones. De éstas, las fracciones II y III eran altamente reactivas en las pruebas de contraelectroforesis con el suero de ratas fasciolosas (12).

En un extensivo trabajo sobre el fraccionamiento de antígenos de Fasciola hepática adulta, se obtuvieron 41 fracciones antigénicas utilizando diversos métodos y probándolas con diferentes pruebas inmunológicas. Se determinó que los antígenos con mayor actividad fueron los antígenos somáticos, los metabólicos y los polisacáridos de la fracción CI, (11).

Se puede observar que existen diversos métodos para obtener y aislar antígenos de Fasciola hepática, por lo cual es difícil determinar cuál o cuáles antígenos son satisfactorios para utilizarse en el diagnóstico práctico de fasciolosis, ya que se han obtenido resultados muy variables (1).

Algunas de las pruebas que se han utilizado para el diagnóstico de fasciolosis incluyen: Pruebas intradérmicas y pruebas serológicas; dentro de las pruebas intradérmicas, se tiene la intradermorreacción que es frecuentemente utilizada

con bovinos y ovinos debido a sus resultados relativamente - confiables, a su bajo costo y a su facilidad para ser aplicada en condiciones de campo. Los tipos de respuesta inflamatoria que se presentán en los animales fasciolosos a la inoculación intradérmica de antígenos de Fasciola hepatica, se pueden observar las siguientes reacciones:

- a) Hipersensibilidad tipo I mediada por IgE, (1, 14, 20).
- b) Hipersensibilidad tipo III o reacción de Arthus mediada por IgG (1, 14, 20).

Dentro de las pruebas serológicas, existen las reacciones de precipitación; la sensibilidad de estas pruebas, como la doble difusión en agar (DD) y la Contraimmunoelectroforesis -- (CIE), generalmente es baja cuando se compara con otras pruebas serológicas, pero es difícil que se presenten reacciones falsas positivas (6, 23). La sensibilidad de la DD por otra parte, es mayor cuando se utiliza la prueba de CIE (23).

También se cuenta con las pruebas de aglutinación, entre las que se encuentra la técnica de la hemaglutinación pasiva que detecta cantidades muy pequeñas de anticuerpos, por lo que - parece ser superior en sensibilidad y especificidad cuando - se compara con otras pruebas (1, 2, 8, 17, 21).

La técnica de Inmunoensayo en capa delgada, que es una nueva técnica adaptada para el diagnóstico de fasciolosis, tiene el atractivo de ser sencilla y susceptible de ser usada con relativa facilidad en condiciones de campo; esta técnica parece tener una aceptable sensibilidad por lo que puede ser útil en muestreos masivos (2, 9, 15).

En los estudios realizados hasta la fecha, la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas utilizadas, se han correlacionado con estudios coproparasitoscópicos (5, 8, 9, 10, 15).

En México, no se han reportado estudios que comprueben la sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas serológicas en fasciolosis mediante la correlación de éstas y el hallazgo de fasciolas en el hígado de los animales al sacrificio, por lo cual se decidió llevar a cabo el presente trabajo.

H I P O T E S I S

En estudios realizados en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, sobre el diagnóstico inmunológico de fasciolosis - en ovinos (9) de una zona enzootica y otra libre de fasciolosis, se observaron los siguientes porcentajes de sensibilidad y especificidad, utilizando el antígeno somático de Fasciola hepatica:

P R U E B A S	% SENSIBILIDAD	% ESPECIFICIDAD
Doble Difusión en Gel (DD).	44.8	100
Contrainmunolectroforesis (CIE).	58.6	78.1
Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD).	93.1	96.8
Hemaglutinación Pasiva (HP).	44.8	100

Se concluyó que una combinación de las pruebas de HP e ICD, puede ser empleada para el diagnóstico de la fasciolosis en los ruminantes.

En estos estudios, se determinó que los animales estaban o no parasitados con Fasciola hepatica, utilizando el examen coproparasitológico (9). El presente trabajo, pretende saber si se encuentran porcentajes semejantes al utilizar esas pruebas, en

una zona ecológica diferente, tomando como animales parasitados aquellos que presentaban fasciolas adultas en hígado y huevecillos en la vesícula biliar.

Se supone que hay una relación directa entre el título de anticuerpos anti-fasciola y el número de fasciolas que se encuentran en el hígado de los borregos, y que las pruebas inmunológicas más adecuadas para detectar esos anticuerpos son la Hemaglutinación pasiva y el Inmunoensayo en capa delgada.

O B J E T I V O S

- 1) . Determinar la especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas serológicas, utilizadas en el diagnóstico de fasciolosis en ovinos, en relación a la presencia - en hígado de Fasciola hepatica y/o sus huevecillos en la vesícula biliar.

- 2) Correlacionar los títulos de anticuerpos detectados -- por diferentes pruebas serológicas y la presencia en - hígado de Fasciola hepatica, y/o sus huevecillos en la vesícula biliar.

MATERIAL Y METODOS.

Obtención del antígeno somático de Fasciola hepatica:(-)

1. Se recolectaron fasciolas adultas de hígados infectados de bovino del rastro.
2. Se procedió a un lavado con solución salina fisiológica, hasta que el sobrenadante se observó claro.
3. Se pesaron 10 gr. de fasciolas y se agregaron 50 ml. de PBS* pH 7.2 y arena de mar estéril en un mortero - en baño de hielo, y se procedió a triturar hasta formar una pasta.
4. Se dejó en agitación lenta (con un rotor magnético) a 4°C durante 24 horas.
5. Se centrifugó a 3,000 rpm. durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada (4°C).

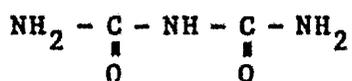
* PBS (Solución salina buferada).

6. El sobrenadante se filtró con un filtro Seitz EKS ó Millipore de 0.22 micras; recolectándolo en tubos de ensaye estériles.
7. La cantidad de proteína se determinó por medio del método de Biuret.
8. El antígeno se envasó en alicuotas y se congeló (-70°C) hasta su empleo (2).

DETERMINACION DE PROTEINA.

Método de "BIURET":

Todas las proteínas contienen gran número de enlaces peptídicos. Si se trata de una solución de proteína con iones Cu^{++} en un medio moderadamente alcalino, se forma un complejo quelato coloreado de composición desconocida entre el ión Cu^{++} y los grupos carbono ($\text{C}=\text{O}$) y $=\text{N}-\text{H}$ de los enlaces de péptido. Ocurre una reacción análoga entre el ión cúprico y el compuesto orgánico biuret, por ello la reacción se llama reacción del Biuret.



En esta reacción, un ión cúprico se enlaza a cuatro o - - seis enlaces peptídicos por enlaces coordinados. (2, 7)

REACTIVO.-

Se disolvieron 1.5 gr. de sulfato de cobre pentahidrato y 6.0 gr. de tartrato de sodio y potasio en 500 ml. de agua. Se añadieron 300 ml. de NaCl al 10% libre de carbonato preparada recientemente. Se agregó agua destilada hasta completar un litro.

ESTANDAR DE PROTEINA.-

Se disolvieron 100 mg. de albúmina sérica bovina en 10 ml. de agua destilada para obtener 10 mg. de proteína/ml.

PROCEDIMIENTO:

Se colocaron las siguientes cantidades en tubos marcados:

	ml. SOLUCION ESTANDAR	ml. AGUA DESTILADA	mg/ml PROTEINA
	0.1	0.9	1
	0.3	0.7	3
	0.5	0.5	5
	0.7	0.3	7
	0.9	0.1	9
	1.0	0.0	10
Blanco	0.0	1.0	0

La muestra problema (antígeno) se diluyó de tal manera que -
tuviera de 1 a 10 mg/ml.

A los tubos con el blanco, estándares y muestra problema, se
le agregó 4 ml. del reactivo del biuret y se mezclaron. Des-
pués de 30 minutos se leyó la absorbancia a 560 nm en un es-
pectrofotómetro (Hitachi, modelo 100-20).

Los resultados se graficaron en papel milimétrico, y se tra-
zó la curva estándar y se interpoló la densidad óptica de la
muestra de antígeno para conocer su concentración de proteí-
na (2).

METODO DE INMUNIZACION.

Preparación del antisuero contra Fasciola hepatica.

MATERIAL. -

1. Antígeno somático de Fasciola hepatica.
2. Adyuvante completo de Freund (ACF)*.
3. Jeringa de 20 ml. con aguja del número 13.
4. Vaso de precipitados.

* DIFCO, Detroit, Michigan, E.U.A.

5. 2 conejos de 2 Kg. de peso, c/u.

PROCEDIMIENTO.-

1. Se colocaron volúmenes iguales de antígeno en solución y adyuvante en un vaso de precipitados.
2. Con una jeringa de 20 ml. con aguja del 13, se mezcló repetidamente el antígeno y el adyuvante; succionando y expeliendo en el vaso de precipitados. Cuando la mezcla comenzó a emulsificar, tomó una apariencia lechosa y espesa.
3. Se continuó mezclando la emulsión hasta que una gota de ésta, cuando se colocó sobre la superficie de un recipiente conteniendo agua, permaneció intacta.
4. El antígeno disuelto con solución salina estéril; emulsificando con ACF se inoculó en dos conejos, de acuerdo con el siguiente protocolo de inmunización:

INOCULACIÓN NUM.	TIEMPO	D O S I S	VIA DE INOCULACION
1	Día 0	5 mg. de Ag disuelto en 1 ml. de solución salina estéril, emulsificado con 1 ml. - ACF.	S.C. en múltiples sitios.

INOCULACION NUM.	TIEMPO	D O S I S	VIA DE INOCULACION
2	Día 15	Igual que antes.	I.M. y S.C.
3	Día 30	0.250 mg. del Ag. en solución salina.	I.M.
4	Día 31	0.500 mg. del Ag en solución salina.	I.M.
5	Día 32	1 mg. del Ag en so- lución salina.	I.M.

El sangrado se practicó en el día 39 (una semana después de aplicar la última dosis) se separó el suero, se dispersó en frascos y se congeló a -70°C hasta su uso (2).

INMUNOELECTROFORESIS.

MATERIAL . -

1. Aparato de electroforesis.
2. Portaobjetos limpios y desengrasados.
3. Pipetas Pasteur.

4. Cámara Húmeda.
5. Agar noble.
6. Merthiolate al 1%.
7. Buffer de barbituratos (pH 8.6, ó 0.1 M, fuerza iónica - 0.05).
8. Antígeno y antisuero específico.

PROCEDIMIENTO.

1. Se prepararon varios portaobjetos con una ligera capa - de agar de impregnación (agar noble al 10%).
2. Después se preparó una solución de agar noble al 1%, en buffer de barbituratos 0.1 M, pH 8.6:
 - a) Buffer de barbituratos:

Barbiturato de sodio	(0.1 M)	500.5	ml.
Acido clorhídrico	(0.1 N)	149.5	ml.
Agua destilada.		350.0	ml.
3. Al final se añadió merthiolate blanco a una concentra-- ción final de 1:10,000.
4. Los portaobjetos con agar de impregnación se colocaron en posición horizontal, y se les agregó 3 ml. de la so- lución de agar al 1% caliente. Se dejó gelificar a tem- peratura ambiente y posteriormente se metieron en una - cámara húmeda hasta su empleo.

5. Las laminillas se perforaron con un molde y se extrajo el agar de la perforación circular solamente. En el recipiente de la unidad de electroforesis se colocó la cantidad necesaria de buffer de barbituratos. Las laminillas perforadas se colocaron y se estableció el contacto entre la placa de agar y el buffer utilizando tiras (mechas) de papel filtro.
6. Se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se ajustó a la corriente a 8-10 volts/cm. de gel 6-8, mAmp/ laminilla por 15 minutos para equilibrar el sistema.
7. Posteriormente con una pipeta Pasteur, se colocó la solución de antígeno en las perforaciones de la placa de agar. Una de las muestras de antígeno se teñió con azul de bromofenol para indicar el desplazamiento.
8. Se checó que las tiras de papel filtro estuvieran bien colocadas y se conectó nuevamente el aparato, cuidando que la corriente fuera correcta. Cuando se observó que la muestra teñida había migrado lo suficiente hacia el polo positivo (ánodo) para una separación correcta, se desconectó el aparato y se removió el agar de la canal para colocar el antisuero. Esto se hizo con rapidez para evitar la difusión excesiva del antígeno.
9. Las laminillas se dejaron en una cámara húmeda durante 24 a 48 horas. Se hizo la lectura en una cámara de fondo oscuro y se dibujaron los resultados obtenidos (2).

TOMA DE MUESTRAS.

MATERIAL.-

1. Tubos de ensaye.
2. Aplicadores de madera.
3. Guantes desechables.
4. Aretes (identificación de animales).
5. Estuche de disección.
6. Frascos estériles.
7. Microscopio Estereoscópico.

PROCEDIMIENTO.-

En el rastro de San Felipe del Progreso, ubicado en el Estado de México, semanalmente se tomaron muestras de sangre y bilis en grupos de 8 a 9 borregos, hasta totalizar 100 animales. - El muestreo duró 3 meses (júlío, agosto y septiembre), con el fin de hacer el hato más representativo de la zona.

Las muestras de sangre se obtuvieron en el momento de sacrificio de los animales previamente identificados; posteriormente se quitó la vesícula biliar y se tomó la muestra de bilis, revisando los conductos biliares y parte del parénquima hepático para verificar la presencia de Fasciola hepatica.

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de ensaye, -- los cuales se dejaron reposar hasta la llegada al laboratorio (3-4 horas en posición horizontal), donde se les quitó el -- coágulo y se centrifugaron (3,000 rpm/10 minutos); el suero -- resultante se colocó en frascos estériles y después se congeló a -20°C hasta ser utilizada.

Las muestras de bilis se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y el sedimento se observó en un microscopio, estereoscópico para observar la presencia de huevecillos de Fasciola hepatica, todo esto con el fin de saber si los animales estaban parasitados.

Se llevó un registro de cada uno de los animales muestreados, en el cual se anotaron los siguientes datos:

- a) Identificación (número).
- b) Edad.
- c) Sexo.
- d) Presencia de huevecillos de Fasciola hepatica en la bilis.
- e) Presencia de Fasciola hepatica en los conductos biliares y parénquima hepático.
- f) Presencia de otros parásitos.
- g) Lesiones en otros órganos.
- h) Otros estados morbosos.

Borregos controles.

Se sacrificaron 15 borregos de raza Tabasco del Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco, Pue. (CEPH), originarios del Centro Experimental Pecuario de Mocochoá, Yuc., donde se considera zona libre de Fasciola hepatica (Bautista, C. Comunicación personal, 1982). Se obtuvieron las muestras de suero y bilis bajo el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

PRUEBA DE DOBLE DIFUSION EN GEL.

MATERIAL.-

1. Matríz de 125 ml.
2. Platina caliente.
3. Portaobjetos desengrasados.
4. Pipetas Pasteur.
5. Cajas de Petri.
6. Aplicadores.
7. Papel filtro.
8. Molde o dado perforador de gel.
9. Agar noble.
10. PBS: pH 7.2

11. Merthiolate al 1 %.
12. Antígeno de Fasciola hepatica.
13. Antisuero.

PROCEDIMIENTO.-

1. En un matr az de 125 ml. se colocaron 50 ml. de PBS pH -- 7.2 y se agregaron 0.5 gr. de Agar noble.
2. Se calentó a fuego lento el agar hasta que no quedaron - grumos. Al final, el volumen perdido por evaporación se repuso con agua destilada y se le agregaron .5 gr. de - - NaCl, para obtener una concentración final del 10% de -- NaCl de acuerdo con el método reportado por Van Tiggele (23).
3. Se le agregó merthiolate blanco a una concentración fi-- nal de 1:10,000 (0.5 ml. de merthiolate al 1 %).
4. Se colocaron los portaobjetos secos y desengrasados en - una superficie plana. Con una pipeta de punta ancha a - cada laminilla se le agregaron 5 ml. del agar caliente y se dejó gelificar a temperatura ambiente.
5. El agar de los portaobjetos fue perforado con un dado o molde perforador y el agar residual se retir  con un - - aplicador.

6. El orificio central de las laminillas se llenó con el antígeno de Fasciola hepatica y los sueros alrededor.
7. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se incubó a temperatura ambiente de 24 a 48 hrs.
8. La lectura para localizar las líneas o bandas de precipiitación se hizo en una cámara de fondo oscuro.
9. Se hizo un esquema de los resultados obtenidos (2).

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

MATERIAL.-

Se empleó el mismo que en inmunolectroforesis.

PROCEDIMIENTO.-

1. Se preparó laminillas en la forma descrita en inmunolectroforesis.
2. Se hicieron seis pares de perforaciones en el agar de -- 3 mm. de diámetro y con una separación de 4 mm. entre caa da par.
3. Se colocaron las laminillas en la cámara y se dejaron -- precorrer por 15 minutos en la forma descrita en inmunolectroforesis.

4. La muestra de antisuero se colocó en el orificio más próximo al polo positivo y al antígeno en el orificio más próximo al polo negativo.
5. Se aplicó la corriente (6-8 mAmp/Laminilla) durante una hora o una hora treinta minutos.
6. Se hizo la lectura en una cámara de fondo oscuro.
7. Se hizo un esquema de los resultados obtenidos (2).

INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA.

MATERIAL.-

1. Antígeno somático de Fasciola hepatica.
2. Antisuero.
3. Suero normal de conejo.
4. Cajas de petri de plástico de 8.5 cm. de diámetro "nuevas".
5. Jeringa de tuberculina con aguja del número 27.
6. Etanol al 70 %.
7. Bomba de vacío.
8. Ventilador.
9. PBS, pH 7.2.

10. Agua destilada.
11. Placas de microtitulación.
12. Microdilutores de 0.05 ml.
13. Pipetas de 0.05 ml.

PROCEDIMIENTO.-

1. Se utilizaron cajas de petri de plástico "nuevas", las cuales se lavaron con etanol al 70%.
2. Las cajas se secaron perfectamente, primero absorbiendo con bomba de vacío y segundo exponiéndolas al aire de un ventilador.
3. Se utilizó antígeno de fasciola con una concentración de proteína de 10 mg/ml., se colocó sobre cada una de las cajas 19.64 ml. de PBS, ph 7.2 más 0.36 ml. de antígeno, obteniendo una concentración final de proteína de 180 microgramas/ml. Para que el antígeno se repartiera uniformemente se hicieron movimientos circulares.
4. Se incubó en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos.
5. Se sacaron las cajas, se eliminó el antígeno y se lavaron tres veces con agua destilada.
6. Se secaron las cajas perfectamente de la forma anteriormente mencionada y quedaron sensibilizadas.

7. En placas de microtitulación se transfirieron 0.05 ml. - de PBS, pH 7.2 con pipeta y 0.05 ml de suero a probar - con un microdilutor. Se hicieron diluciones dobles pa-- sando 0.05 ml a cada hoyo y se eliminaron los 0.05 ml. del último hoyo.
8. Se colocaron 5 microlitros de cada una de las diluciones con una separación aproximada de 1 cm.
9. Se incubó en una cámara húmeda a 37°C por 60 minutos.
10. Las cajas se sacaron e invirtieron sobre su cubierta, la cual se llenó con agua a 60°C. Esto se hizo por un tiempo aproximado de 60 segundos.
11. Después cada caja se levó tres veces con agua destilada.
12. Se secaron las cajas perfectamente de la forma anteriormente mencionada (2).
13. Nuevamente las cajas se invirtieron sobre su cubierta, - la cual se llenó con agua a 60°C. Esto se hizo por un - tiempo aproximado de 45 a 120 segundos.

INTERPRETACION DE LA PRUEBA:

En los sitios donde se colocaron los sueros se observó una -- condensación mayor en comparación con el resto de la caja y - ésta fue inversamente proporcional a la dilución de los sue--

ros. La lectura se hizo tomando en cuenta los siguientes parámetros (2, 15):

(+) Gotas grandes que llenan la superficie de aplicación del suero.

(-) Patrón de condensación igual a las áreas donde no se aplicó suero.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA.

MATERIAL.-

Equipo:

1. Centrífuga, capaz de 800 X gr.
2. Baños María, 37 y 56°C.
3. Tubos de centrifuga cónicos graduados de 12 ml.

Material de Cristalería:

1. Pipetas serológicas.
2. Matraces.
3. Vasos de precipitados.
4. Tubos de ensaye de 10 X 75 mm.

5. Equipo de microtitulación:

- a) Pipetas de 0.05 ml. y 0.025 ml.
- b) Microdilutores de 0.05 ml.
- c) Vibrador.

Reactivos:

- 1. Solución de Alsever.
- 2. Solución salina buferada (PBS ph 7.2 y pH 6.4).
- 3. Suero normal de conejo (SNC).
- 4. Acido Tánico.
- 5. Antígeno.
- 6. Suero positivo de título conocido y suero control negati
vo.
- 7. Eritrocitos de carnero (las células se añejaron 3 días a
4°C antes de ser usadas).

Preparación de Reactivos:

Solución Anticoagulante.

Solución de Alsever:

Dextrosa.....	2.05	gr.
Citrato de sodio dihidratado.....	0.8	gr.
Cloruro de sodio.....	0.42	gr.

Acido cítrico.....0.055 gr. ó 055 ml. de
Acido acético al 10 %.
Agua destilada.....100.00 ml.
(Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C).

Solución salina buferada (PBS):

Soluciones Stock:

Na_2HPO_4 , 0.15 M...21.3 g/litro de agua destilada.
 KH_2PO_4 , 0.15 M...20.4 g /litro de agua destilada.
 NaCl , 0.15 M...8.8 g /litro de agua destilada.

PBS, pH 6.4:

Na_2HPO_4 , 0.15 M...32.3 ml.
 KH_2PO_4 , 0.15 M...67.7 ml.
 NaCl , 0.15 M...100.0 ml.

PBS, pH 7.2:

Na_2HPO_4 , 0.15 M...76.0 ml.
 KH_2PO_4 , 0.15 M...24.0 ml.
 NaCl , 0.15 M...100.0 ml.

Diluyente: Suero normal de conejo (SNC) al 1%.

Se inactivó suero de conejo normal a 56°C por 30 minutos. Se absorbió con G.R. de carnero, (0.1 ml. G.R. + 0.9 ml. suero e incubar por 30 minutos a 37°C). Se mezcló 1 ml. de suero en 99 ml. de PBS, pH 7.2.

Preparación de las diluciones de ácido tánico, 1:1,000 y - -
1:20,000.

Inmediatamente antes de usarse, se preparó una solución fresca de una dilución 1:1,000 de ácido tánico, disolviendo 20 mg. de ácido tánico en 20 ml. de PBS, pH 7.2. Se diluyó la solución stock 1:1,000 a 1:20 para obtener la dilución de - - - 1:20,000 que se usó en la prueba (2.0 ml. de 1:1,000 + 38.0 ml. PBS, pH 7.2).

A. TÁNIZADO DE G.R.*

1. Se lavó los G.R. 3 veces en PBS, pH 7.2 - 800 X gr. por 5 minutos 2 veces y por 10 minutos una vez.
2. Se puso 1 ml. del paquete de G.R. en 39 ml. de PBS, pH 7.2 para obtener una suspensión al 2.5%.

* G.R. "Gibco" de ref. 1000.

3. Se añadió un volumen igual (40 ml.) de solución de ácido tánico 1:20,000; se mezcló e incubó en un baño María a 37°C por 10 minutos.
4. Se sacaron los G.R. del baño María y se centrifugaron -- por 5 minutos a 800 x gr. El sobrenadante se descartó, y se lavó con PBS, pH 7.2, a 800 x gr. por 10 minutos, - los G.R. se resuspendieron en PBS, pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5% (1 ml. G.R. + 39 ml. PBS).

B: SENSIBILIZACION DE G.R.

1. Para sensibilizar los G.R. tanizados se agregó un volu-- men igual de una dilución óptima de antígeno en PBS pH - 6.4 a la suspensión de células y se incubó en un baño -- María de 37°C por 15 minutos.

Determinación de la concentración óptima de antígeno:

- a) Se preparó 4 diluciones de antígeno en PBS pH 6.4 -- por ejemplo: 1:25, 1:50, 1:100, 1:150.
- b) Se sensibilizaron los G.R.
- c) Se utilizó un suero negativo y otro positivo por ca-- da dilución. (la concentración más baja del antígen-- no que da el mayor título con el suero inmune y que no reaccione con el suero negativo es considerada co mo óptima).

2. Se centrifugó a 800 x gr. por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y después se lavaron las células 2 veces -- con SNC al 1% en PBS, pH 7.2; la primera a 800 x gr. por 5 minutos y la última a 800 x gr. por 10 minutos.
3. Se ajustaron los G.R. a una suspensión al 1.5% en SNC -- 1% (por ejemplo: 0.15 ml. del paquete de G.R. + 9.85 ml. de SNC 1%).

C- PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.

1. Se inactivaron los sueros por 30 minutos a 56°C.
2. En placas de microtitulación se transfirieron 0.05 ml. - de SNC 1% con una pipeta a los hoyos en donde se iban a hacer las diluciones.
3. Se transfirieron 0.05 ml. de cada suero a probar, con un microdilutor al primer hoyo que contenía 0.05 ml. de SNC al 1%.
4. Se hicieron doce diluciones pasando 0.05 ml. de suero a cada hoyo y eliminando los 0.05 ml. del último hoyo.
5. Las diluciones se mezclaron poniendo las placas en un -- vibrador. Con una pipeta se agregó 0.025 ml. de la solución sensibilizada de G.R. al 1.5% a cada dilución de -- suero.

6. Se mezcló con el vibrador y se dejaron las placas incubando a 4°C por 12 horas.
7. Se hizo la lectura por medio de los patrones en el fondo de los hoyos (2).

CONTROLES.

Control del Diluyente. Se transfirieron 0.05 ml. de SNC 1% a varios hoyos y se agregaron 0.025 ml. de los G.R. sensibilizados al 1.5%. Esta reacción fue negativa.

Control del suero. Se preparó una suspensión al 1.5% de G.R. tanizados no sensibilizados en suero normal de conejo al 1%. Se preparó una placa por duplicado con diluciones seriadas de los sueros a ser probados, 6 hoyos de cada suero en vez de -- 12. A cada hoyo se le añadieron 0.025 ml. de G.R. tanizados no sensibilizados al 1.5%. Se obtuvo una reacción negativa - (2).

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas se determinó -- de la siguiente manera (9):

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{NUM. DE ANIMALES CON FASCIOLASIS, POSITIVOS A LA PRUEBA.}}{\text{NUM. TOTAL DE ANIMALES CON FASCIOLASIS.}} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{NUM. DE ANIMALES SIN FASCIOLASIS, NEGATIVOS A LA PRUEBA.}}{\text{NUM TOTAL DE ANIMALES SIN FASCIOLASIS.}} \times 100$$

R E S U L T A D O S

DETERMINACION DE PROTEINA:

Utilizando el método de Biuret se obtuvieron 10 mg. de proteí
na / ml. del antígeno somático de Fasciola hepatica.

INMUNOELECTROFORESIS:

Utilizando el antígeno somático de Fasciola hepatica y su res
pectivo antisuero se observaron 12 sistemas antígeno anticuer
po (fig. 1).

MUESTREO DE LOS BORREGOS:

De los 100 borregos del rastro que fueron examinados, se en--
contró que 38 estaban parasitados. De los cuales el 81.57 %
presentó Fasciola hepatica en los conductos biliares y un - -
18.42% no presentó fasciolas en el hígado, pero sí se halla--
ron huevecillos del parásito en la bilis.

Cabe hacer la observación, de que el 89.47% de los animales -
parasitados presentó fasciolas en el hígado y sus huevecillos
y un 7.89% no presentó huevecillos, pero si se hallaron fas--
ciolas en los conductos biliares.

De los 38 animales que resultaron positivos a Fasciola hepatica, presentaron los siguientes estados patológicos (13):

Ectima contagioso	2.63 %
Queratitis de causa desconocida	2.63 %
<u>Thysanosoma actinioides</u> (en los conductos biliares y vesícula biliar)	2.63 %

De los 62 animales que resultaron negativos a Fasciola hepatica, presentaron los siguientes estados patológicos (13):

<u>Thysanosoma actinioides</u> (en los conductos biliares y vesícula biliar)	8.0 %
Ectima contagioso	4.8 %
Hígados fibrosos con abscesos (de causa desconocida)	3.2 %
Diarreas (de causa desconocida)	1.6 %
Pseudotuberculosis (Linfadenitis caseosa)	1.6 %

Al examinar a los borregos controles, se observó que estaban libres de Fasciola hepatica.

PRUEBA DE DOBLE DIFUSION EN GEL:

De los 100 sueros de borregos del rastro probados con la técnica de doble difusión en gel, se encontraron 18 reacciones de precipitación; de las cuales 9 correspondieron a animales positivos y 9 fueron reacciones falsas positivas.

La prueba tuvo una sensibilidad del 23.68% y una especificidad del 85.48% (cuadro 1), los sueros de los borregos control fueron negativos.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS:

En esta prueba de los 100 sueros del rastro, hubo 47 reacciones de precipitación, de las cuales 21 correspondieron a animales positivos y 26 a animales negativos (falsos positivos).

Esta prueba tuvo una sensibilidad del 55.26% y una especificidad del 58.06% (cuadro 1).

Los sueros control fueron negativos, excepto en dos en los que hubo bandas de precipitación (falsos positivos).

PRUEBA DE INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA:

En esta prueba al correr los 100 sueros de los animales del rastro y 15 sueros de los animales control, se vió que reac--

cionaron con diferentes títulos (cuadro 2).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se vió que considerando un título de 1:32 en adelante hubo 45 reacciones positivas, de las cuales 24 correspondieron a animales parasitados y 21 resultaron falsos positivos, que nos da un porcentaje de sensibilidad del 63.15% y una especificidad del 67.74%. Sin embargo, considerando un título de 1:64 o mayor, hubo 26 reacciones positivas, las cuales 16 correspondieron con animales parasitados y 10 resultaron falsos positivos, que nos dá un porcentaje de sensibilidad del 42.10% y una especificidad del 83.87% (cuadro 1, fig. 2).

De tal manera que en este estudio se decidió tomar un título de 1:64 en esta prueba, para dar un animal como positivo.

El suero hiperinmune de conejo anti-Fasciola hepatica dió un título en esta prueba hasta de 1:128.

HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA:

En esta prueba, al correr los 100 sueros de los borregos del rastro y 15 sueros de los animales control, se vió que reaccionaron con diferentes títulos (cuadro 3, fig. 3).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se observó que - considerando un título de 1:64 en adelante, se obtuvieron 28 reacciones positivas, de las cuales 16 correspondieron a -- animales parasitados y 12 fueron falsas positivas, lo que nos dá un porcentaje de sensibilidad del 42.10 % y una especificidad del 80.64 %. Sin embargo, considerando un título de - -- 1:128 o mayor, hubo 16 reacciones positivas, las cuales 11 correspondieron a animales parasitados y 5 fueron falsas positivas, que nos dá un porcentaje de sensibilidad del 28.94 % y una especificidad del 91.93 % (cuadro 1, fig. 3).

En base a estudios anteriores (9) se decidió tomar, como positivo a aquél animal que diera un título de 1:128 o mayor.

El suero hiperinmune de conejo anti Fasciola hepatica, dió un título en esta prueba, de 1:4.096 (control positivo).

El suero normal de conejo, reaccionó en esta prueba, dando títulos, algunas veces, de 1:2 (control negativo).

En el cuadro 4 se puede observar la relación entre el grado - de fasciolosis y la detección de anticuerpos anti-fasciola, - por medio de las pruebas serológicas utilizadas.

De 38 borregos con fasciolas en el hígado y/o sus huevecillos, 6 (15.78 %) estaban muy parasitados, 15 (39.47 %) estaban regularmente parasitados, 9 (23.68 %) estaban poco parasitados y 35 (92.10 %) tenían huevecillos de este tremátodo en la ve-

sícula biliar. Además de fasciolosis, 3 (7.8%) de los 38 animales tenían otros procesos morbosos.

De los 38, 8 animales (21.05%) fueron detectados por medio de la prueba de DD, 22 (57.89%) con la prueba de CIE, 11 (28.94%) con la prueba de HP y 16 (42.10%) con la prueba de ICD.

En el cuadro 5, se determinó la relación entre el grado de fasciolosis en ovinos y el número de pruebas serológicas que detectaron anticuerpos anti-fasciola.

De los 38 animales, 6 (15.78%) estaban muy parasitados. De éstos, 3 (7.89%) reaccionaron a una prueba, 2 (5.26%) a dos pruebas y uno (2.63%) a tres pruebas.

Quince animales (39.47%) estaban medianamente parasitados. De éstos, uno (2.63%) no reaccionó con ninguna prueba, 6 (15.78%) reaccionaron a una prueba, 4 (10.52%) a dos pruebas y 4 (10.52%) a 3 pruebas.

Nueve borregos (23.68%) estaban poco parasitados. De éstos, uno (2.63%) no reaccionó a ninguna prueba, 5 (13.15%) reaccionaron a una prueba, 2 (5.26%) a dos pruebas y uno (2.63%) a tres pruebas.

Ocho animales (21.05%) que se les encontró sólo huevecillos del tremátodo. Tres (7.89%) no reaccionaron a ninguna prueba, 2 (5.26%) reaccionaron a una prueba; 2 (5.26%) a dos pruebas y uno (2.63%) a tres pruebas.

Por otro lado, cabe señalar que ninguno de los 38 ovinos fasciolosos reaccionó a las cuatro pruebas.

FIGURA I



Patron Immunolectroforético del antígeno somático
de Fasciola hepatica

COMPARACION DEL PORCENTAJE DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA ENTRE UN GRUPO DE BORREGOS DEL RASTRO Y OTRO DE ANIMALES CONTROL

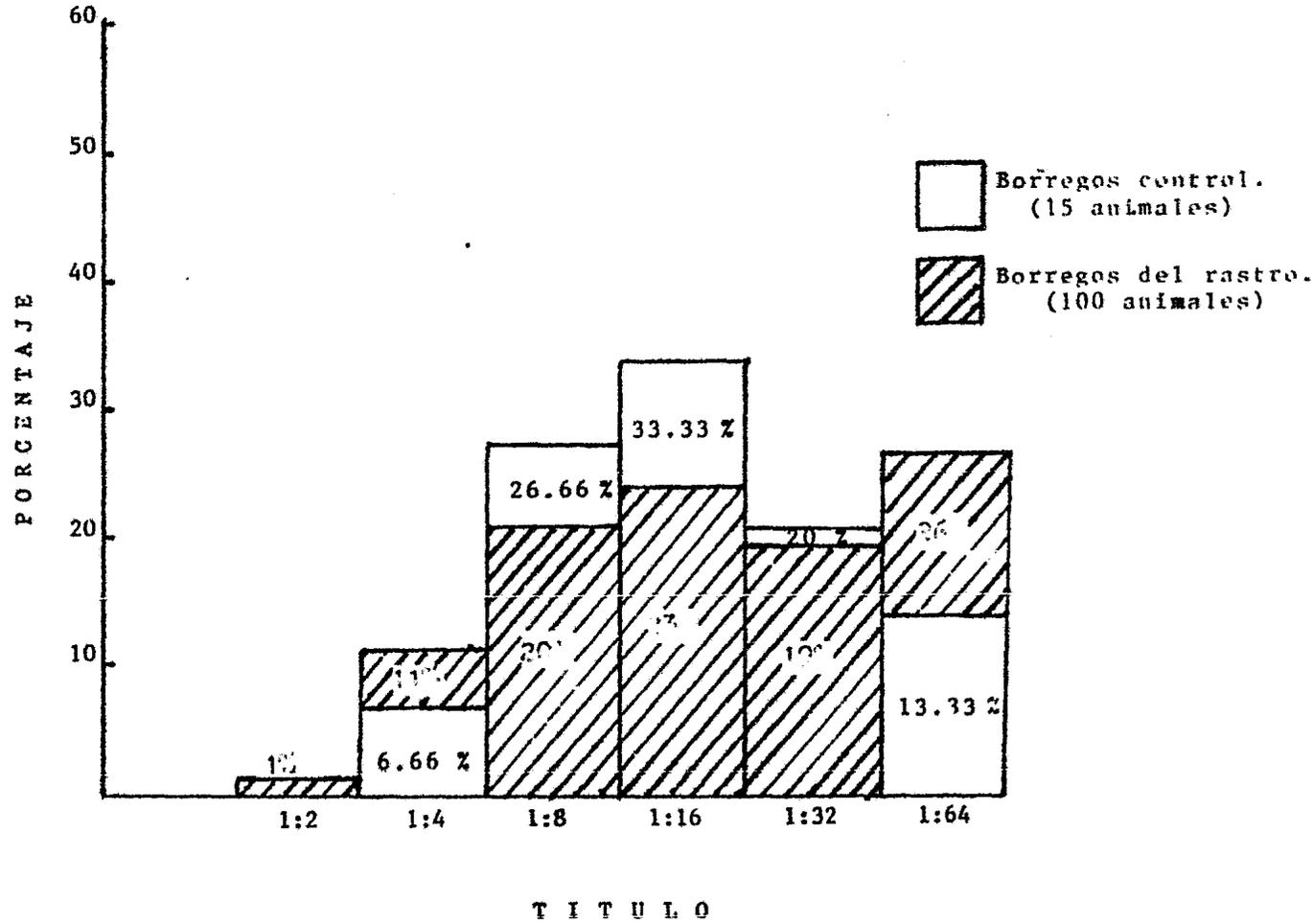


FIGURA 2

Se consideró como positivo un título de 1:64

COMPARACION DEL PORCENTAJE DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA ENTRE UN GRUPO DE BORREGOS DEL RASTRO Y OTRO DE ANIMALES CONTROL

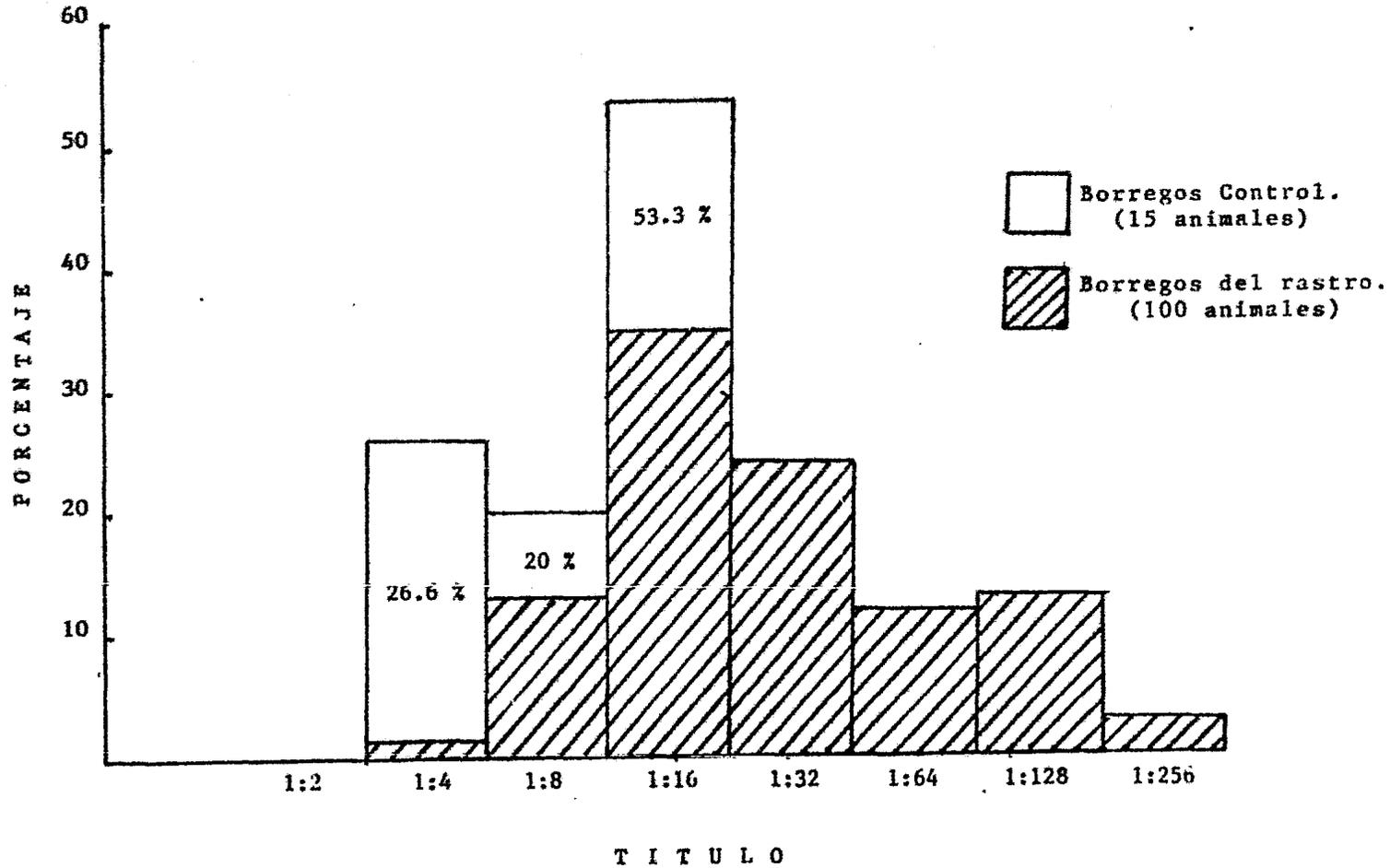


FIGURA 3

Se consideró como positivo un título de 1:128 ó mayor.

CUADRO 1

Porcentajes de sensibilidad y especificidad de distintas - - pruebas serológicas, para el diagnóstico de la fasciolosis - en ovinos, utilizando un antígeno somático de Fasciola hepatica.

P R U E B A S	% SENSIBILIDAD	% ESPECIFICIDAD
Doble difusión en Gel.	23.68	85.48
Contrainmunolectroforesis.	55.26	58.06
Inmunoensayo en Capa - Delgada.	42.10	83.87
Hemaglutinación Pasiva.	28.94	91.93

TITULO DEL SUERO	NUM. DE ANIMALES DEL RAS TRO QUE REACCIONARON A - LAS DIFERENTES DILUCIO-- NES DEL SUERO (100).	NUM. DE ANIMALES CONTROL QUE REACCIONARON A LAS - DIFERENTES DILUCIONES -- DEL SUERO (15).
1:2	1	0
1:4	11	1
1:8	20	4
1:16	23	5
1:32	19	3
1:64	26	2

INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA

CUADRO 2

TITULO DEL SUERO	NUM. DE ANIMALES DEL RASTRO QUE REACCIONARON A LAS DIFERENTES DILUCIONES DEL SUERO (100).	NUM. DE ANIMALES CONTROL QUE REACCIONARON A LAS DIFERENTES DILUCIONES DEL SUERO (15).
1:2	0	0
1:4	1	4
1:8	13	3
1:16	34	8
1:32	24	0
1:64	12	0
1:128	13	0
1:256	3	0

HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA

CUADRO 3

RELACION ENTRE EL GRADO DE PARASITOSIS (FASCIOLASIS) DE BORREGOS Y LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-FASCIOLA POR MEDIO DE PRUEBAS SEROLOGICAS

+++ Muy parasitados (fasciolas adultas en el hígalo)
 ++ Regularmente parasitados.
 + Poco parasitados.
 H.V.B. Huevecillos de Fasciola hepatica en la vesícula biliar.

BORREGO NUM.	GRADO DE PARASITOSIS				OTROS ESTADOS PATOLOGICOS	PRUEBAS SEROLOGICAS			
	+++	++	+	H.V.B.		DD.	CIE.	HP.	ICD.
1			+	+++		+	+	+	
2			+	++			+		
3			+	+++				+	
4			+	+++			+		
5				++		+	+		
6		+		+		+	+	+	
7		+		+		+			+
8		+		+					+
9				+			+		+
10				+					
11	+			+++				+	
12	+			+++			+		+
13		+		+++	Queratitis		+		
14		+		+++		+	+		+
15				++					+
16			+				+		
17			+				+	+	
18			+						
19		+		+++					+
20				++					
21		+		+++			+		
22				+++			+		
23		+		+++			+		
24				+		+	+	+	
25		+		+					
26		+		+				+	+
27		+		+					+
28		+		+		+	+	+	
29			+	++	Ectima C.		+	+	
30	+			+++		+	+	+	
31		+		+++			+	+	+
32		+		+++			+		+
33				+++					
34	+			+++			+		+
35		+		+++			+		+
36	+			+++					+
37	+			+++	Thysanosoma s.				+
38			+	+++					+
TOTAL	6	15	9	35	3	8	22	11	16
%	15.78	39.47	23.68	92.1	7.8	21.05	57.89	28.94	42.10

CUADRO 5

Relación entre el grado de fasciolosis en ovinos y el número de pruebas serológicas que detectaron anticuerpos anti-fasciola.

GRADO DE PARASITOSIS	NUM. DE ANIMALES	NUM. DE PRUEBAS SEROLOGICAS CON LAS QUE REACCIONARON	% +
M.P.	3	1	7.89
M.P.	2	2	5.26
M.P.	1	3	2.63
R.P.	1	0	2.63
R.P.	6	1	15.78
R.P.	4	2	10.52
R.P.	4	3	10.52
P.P.	1	0	2.63
P.P.	5	1	13.15
P.P.	2	2	5.26
P.P.	1	3	2.63
H.V.B.	3	0	7.89
H.V.B.	2	1	5.26
H.V.B.	2	2	5.26
H.V.B.	1	3	2.63
TOTAL	38		

+ 38 animales fueron positivos a la infección por Fasciola hepatica.

M.P. = Muy parasitados.

R.P. = Regularmente parasitados.

P.P. = Poco parasitados.

H.V.B. = Animales que sólo presentaron huevecillos de Fasciola hepatica en la vesícula biliar.

D I S C U S I O N

En el presente estudio, de las diferentes pruebas, se observó lo siguiente:

Con los sueros de los 100 borregos sacrificados en el rastro de San Felipe del Progreso, Estado de México y utilizando la prueba de doble difusión en gel (DD), solamente 9 dieron reacciones que correspondían a animales parasitados y 9 dieron -- reacciones falsas positivas, lo que nos dió una sensibilidad del 23.68% y una especificidad del 85.45% (cuadro 1); los con-- troles que provenían del Centro Experimental Pecuario de - -- Hueytamalco, Puebla (CEPH), fueron negativos.

Esto nos confirma que la prueba de doble difusión en gel es - poco sensible, ya que sólo detectó 9 (23.68%) de 38 animales con Fasciola hepatica, pero tiene una alta especificidad com-- parada con otras pruebas de precipitación, como es la contra-- inmunolectroforesis (2, 9, 15, 23).

Esta prueba, a pesar de ser la más sencilla, es poco sensible y por lo tanto es inadecuada para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos; los resultados obtenidos en el presente estu-- dio, concuerdan con los publicados por Gómez, Arriaga y Morilla (9) y Van Tiggele (23).

En la prueba de contrainmunolectroforesis (CIE), de los 100 sueros de borregos del rastro probados, hubo 47 reacciones de precipitación. De éstas, 21 correspondieron a animales fasciolosos y 26 a ovinos falsos positivos. Los porcentajes de sensibilidad (55.26%) y especificidad (58.06%) de la prueba, corroboran que ésta es más sensible, pero menos específica -- que la doble difusión en gel (cuadro 1). Posiblemente a esto se debe el porcentaje relativamente elevado (41.93%) de animales falsos positivos.

Las reacciones falsas positivas observadas, probablemente también se deben a que el antígeno somático utilizado es complejo y algunos de sus componentes reaccionan en forma inespecífica. Es de hacer notar que dos sueros de animales control negativos, dieron bandas de precipitación en la prueba. Los resultados obtenidos con ésta, concuerda con los reportados por Gómez, Arriaga y Morilla, (9).

De las pruebas serológicas empleadas, la técnica de inmunoensayo en capa delgada (ICD), fue la que mejores resultados dió, pues tuvo una sensibilidad del 42.10% y una especificidad del 83.87% (cuadro 1). Esta técnica parece tener una buena sensibilidad y una aceptable especificidad, lo que concuerda con otros trabajos publicados (9, 15).

En esos estudios, se había sugerido tomar un título de 1:8, para considerar a un animal como positivo a la infección por

fasciola. En el presente trabajo se decidió tomar un título de 1:64, para considerar a un animal como positivo, basándonos en los títulos obtenidos en los animales del rastro y los borregos control negativos (cuadro 2, fig. 2).

Nuestros resultados difieren un poco de los de Gómez, Arriaga y Morilla, (9, 15) debido a que posiblemente se efectuaron con animales de una zona ecológica diferente y a otras razones que se mencionan más adelante.

En esta prueba se tuvo un porcentaje del 16.12% de animales falsos positivos; una explicación a este hecho, puede ser la observada por Gómez, Arriaga y Morilla (15), en la cual ICD resultó ser más específica en los bovinos que en los ovinos, a diferencia de otras pruebas, como la HP que dió títulos más altos en ovinos que en bovinos.

La prueba de hemaglutinación pasiva (HP), por otro lado, detectó 16 reacciones positivas de los animales del rastro; de éstas, 11 (28.94%) correspondían a animales fasciolosos y 5 (8.06%) a borregos no fasciolosos (falsos positivos); la sensibilidad fue del 28.94% y la especificidad del 91.93% (cuadro 1) y concuerda con lo observado en otros trabajos (9,10).

Sin embargo, en esos estudios se tomó un título de 1:64 para considerar a un animal como positivo a la infección por fasciola. En el presente trabajo, se decidió tomar un título de

1:128 en adelante, ya que si se consideraba un título de 1:64 aumentaba el número de animales falsos positivos.

Cabe hacer la observación de que los ovinos control negativos del CEPH no tuvieron títulos mayores de 1:16 (cuadro 3, fig.- 3).

Los resultados en la prueba de HP, no fueron tan satisfactorios como los obtenidos anteriormente por Gómez, Arriaga y Morilla (9, 10), sin embargo, esta prueba, una vez más demostró su alta especificidad en nuestro trabajo.

Las reacciones falsas positivas observadas, al utilizar las diferentes pruebas serológicas, pueden haber ocurrido por las siguientes razones:

1. Zona ecológica diferente (zona de moderada incidencia).
2. Posiblemente algunos de los animales falsos positivos, en realidad tenían fasciolas, pero en una etapa migratoria. Se hizo el examen post-mortem, pero no sabemos si las fasciolas estaban migrando o los animales tuvieron la infección, pero fueron tratados y no presentaban los parásitos al momento de examinar el hígado.
3. El manejo de los animales era marcadamente distinto al de los borregos del estudio de Gómez, Arriaga y Morilla, (9, 15) o sea, esos animales, a diferencia de los examinados

dos por nosotros, provenían de centros experimentales cuyas condiciones de manejo son buenas (alimentación, desparasitación, vacunaciones).

En el cuadro 4 se puede observar que el grupo de borregos con un grado de fasciolosis mediana, fue el que mejor reaccionó con las pruebas serológicas. Posiblemente esto se deba, a que el sistema inmunocompetente de los borregos esté reconociendo eficazmente los antígenos de fasciola recién llegados a los conductos biliares. Los animales con una infección leve, fueron detectados en un porcentaje regular, pero mayor que los muy parasitados. Es probable que en los animales con infecciones leves, las fasciolas apenas comienzan a estimular al sistema inmunocompetente, por lo cual no hay una cantidad óptima de anticuerpos anti-fasciola. El relativamente bajo porcentaje de borregos muy parasitados, detectados por pruebas serológicas, quizá se deba a que cuando existen grandes números de fasciolas, éstas producen una gran cantidad de antígenos que consumen a los anticuerpos circulantes, y forman complejos antígeno-anticuerpo (23).

La prueba que más animales fasciolosos detectó, fue la de CIE y luego le siguieron la de ICD y HP (cuadro 4). Sin embargo, la técnica de CIE es menos específica, posiblemente porque detecta anticuerpos de la clase IgM principalmente y éstos pueden reaccionar en forma inespecífica.

En el cuadro 5, se observa que la mayoría de los animales - - fasciolosos, reaccionaron a 1 prueba serológica y le siguen - las que reaccionaron a 2 pruebas y luego los que reaccionaron a 3 pruebas. Esto se puede deber a los diferentes grados de sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas.

Otros estados patológicos (cuadro 4) no parecieron afectar el desarrollo de las pruebas serológicas utilizadas. .

C O N C L U S I O N E S

1. De los 100 sueros del rastro corridos, con la prueba de doble difusión en gel (DD), se obtuvo una sensibilidad -- del 23.68% y una especificidad del 85.48%; en la técnica de contrainmunolectroforesis (CIE) resultó una sensibilidad del 55.26% y una especificidad del 58.06%. La técnica de inmunoensayo en capa delgada, fue la que dió mejores resultados con una sensibilidad del 42.10% y una especificidad del 83.87%, la hemaglutinación pasiva (HP) tuvo una sensibilidad del 28.49% y una especificidad del 91.93%.
2. De las pruebas evaluadas, las de ICD e HP dieron los mejores resultados.
3. Se observó que las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos en este estudio, dieron porcentajes de sensibilidad y especificidad un poco diferentes a los observados con anterioridad.
4. Al correlacionar los títulos de anticuerpos detectados -- por las diferentes pruebas serológicas, se observó, que el grupo de borregos con un grado de fasciolosis mediana fue el que mejor reaccionó con las pruebas serológicas -- (cuadro 4 y 5).
5. Para hacer un diagnóstico de fasciolosis lo más acertado posible, se sugiere utilizar una combinación de las técnicas de inmunoensayo en capa delgada y hemaglutinación pasiva.

LITERATURA CITADA

1. Bautista G. C.R.: Inmunología en la fasciolosis. Memorias del curso de actualización en Inmunología Veterinaria. Ciudad Universitaria D. F., del 25 al 29 de agosto de 1980. 84 - 99 .
2. Bautista G. C.R., Morilla G. A. (Ed.) Inmunología Veterinaria Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación Pecuaria en México, A. C. - 1981.
3. Biguet J., Capron A., Tran V.R.: Les antiens de Fasciola hepatica. Etude electrophoretique, identification - des fraction et comparaison a avec les antigens correspondant á sept autres heminthes. Annls Parasitol. Hum. Comp. 37: 221 - 231, 1962.
4. Departamento de Análisis Epizootiológicos de la Subdirección de Epizootiología. Dirección General de Sanidad - Animal. S.A.R.H. 1980.
5. Enriquez A.S.: Evaluación de la prueba intradérmica y examen coproparasitoscópico en el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad

de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 1971.

6. Fundenberg, H.H., Stites, D.P., Cadwell, J.L., Wells J.V.: Basic and clinical Immunology, 3rd. edition. Lange. Los Altos California, 1980.
7. Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.: Methods in - Immunology 3a. Ed. W.A. Benjamín, Massachusetts. 1977.
8. Garrido, M.P., Milian, S.F.: Evaluación de la prueba de Hemoaglutinación Pasiva (HP) en ovinos fasciolosos, para estudios epidemiológicos. Memorias de la XV Reunión - - Anual Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, -- S.A.R.H. 504-506 1981.
9. Gómez, A., Arriaga, C. Morilla, A.: Evaluación de los an tígenos somáticos y metabólicos de Fasciola hepatica en - las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la - -- fasciolosis en rumiantes. Memorias de la XV Reunión - -- Anual. Instituto Nacional de la Investigación Pecuaria. S.A.R.H. 497-500 1981.
10. Gómez A., Arriaga C., Sánchez A., Morilla A.: Estudio -- comparativo de dos antígenos somáticos de Fasciola hepati

ca y su aplicación en el diagnóstico de fasciolosis en bovinos y ovinos. Primera Reunión Anual de Parasitología Veterinaria. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, A.C., México, D. F. 15. 1980.

11. Gundlach, J.L: Studies on the serological activity of -- Fasciola hepatica. L. Antigens. Acta Parasitol Pol., -- 19:9-47. 1971.
12. Hillyer, G.V., Santiago, N.W.: Partial purification of - Fasciola hepatica antigen for the immunodiagnosis of - -- fasciolosis in rats., J. Parasit., 63: 430-433. 1977.
13. Jensen, R., Britton, L.: Diseases of Sheep, 2rd. edition. Lea and Febiger. Philadelphia, 1982.
14. Lebrija A., Ibarra, D., Gómez, A.A., Arriaga, C., Ibarra F., Morilla, A.: Algunas características de la prueba -- de intradermoreacción para el diagnóstico de la fasciolosis en los bovinos. Vet. Méx. 12: 5-12, 1981.
15. Morilla, A., Arriaga, C., Gómez, A.: Evaluación preliminar de la prueba de Inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico de la fasciolosis en animales. Vet. Méx. 3: 181 - 186, 1979.

16. Movsesijan, M., Jovanović, B.: Immune response of sheep to Fasciola hepatica infection. Res. Vet. Sci. 18: - - 171-174. 1975.
17. Najera, F.: Clases de Inmunoglobulinas en ovinos infectados con Fasciola hepatica. XV Reunión Anual. Instituto de Investigaciones Pecuarias. S.A.R.H. 555-559. 1981.
18. Nájera, F.: Fasciolasis. Curso de actualización sobre - Zoonosis Parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. - 236-50. Agosto 1982.
19. Quiroz, R.H.: Parasitología y enfermedades parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universi-- dad Nacional Autónoma de México. México 20, D. F. - - - 106 - 114, 1977.
20. Quiroz, R.H., Herrera, R.D., Fernández de Córdova, L.: -- Valoración de la Intradermoreacción en el diagnóstico de la fasciolosis bovina. Vet. Mēx. 4: 236-239. 1973.
21. Robert, R., Leynia, J.P., Chabasse, D., Mahaza, C., Bizon, C.: Contribution au diagnostic immunologique de la fassgiolose a Fasciola hepatica chez les bovins: Recherche D'Ag

Fraction II et D'Ac Antifraction II. Res. Med. Vet., - -
156: 533-538. 1980.

22. Sinclair, K.B.: The resistence of sheep to Fasciola --
hepatica: Studies on the pathophysiology of challenge -
infections. Res. Vet. Sci. 19: 296-303. 1975.

23. Tiggele, L.J. Van: Host-parasite relation in Fasciola -
hepatica infections. Immunopathology and diagnosis of -
liver-fluke disease in ruminants. Tesis. Rijksuniversi-
teit te Leiden, Netherlands. 1978.

24. Uribe, Ar. R.: Epizootiología de la Fasciola hepatica -
en ganado bovino, en la región de la Laguna de Zacoalco,
Jal. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Vete-
rinaria y Zootecnia. U.N.A.M. 1974.