

2.4/170



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DOT-ELISA
PARA EL DIAGNOSTICO DE LA FASCIOLASIS EN
OVINOS Y SU CORRELACION CON HEMAGLU-
TINACION PASIVA E INMUNOENSAYO EN CAPA
DELGADA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
B I O L O G O
P R E S E N T A ;

RICARDO PANIAGUA MARTINEZ

DIRECTOR: M en C ANGELA RUIZ-NAVARRETE MUÑOZ
ASESOR: DR. HECTOR BARBOSA NAJERA

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1989



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 está 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.

INTRODUCCION

GENERALIDADES

La fasciolosis, también conocida como mal de botella o hígado picado; es una enfermedad parasitaria causada por el tremátodo Fasciola hepatica que invade el parénquima hepático y conductos biliares de ovinos, bovinos, caprinos, porcinos y humanos.

Esta enfermedad es cosmopolita por su distribución aunque su importancia económica radica en que afecta a especies zootécnicas, también se presenta en otros animales, los que actúan como reservorios y diseminadores, como: venado, elefante, canguro, castor, conejo, liebre, perro y gato. (56, 45).

Esta parasitosis ha sido registrada en forma de epidemia en humanos, especialmente en Inglaterra, Francia, Italia, Alemania y Cuba (52). Así mismo se ha señalado en Sudamérica, América Central, Asia, Africa y Australia.

México posee una gran variedad de climas donde las condiciones prevalentes favorecen la existencia de los hospederos intermediarios de este tremátodo y por ende la presencia de fasciolosis; la enfermedad prevalece en lugares con clima cálido y lluvioso durante la mayor parte del año y con una temperatura media anual superior a 20°C, como en el caso de los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas; contrasta con estados de clima desértico o semiárido con lluvias irregulares o escasas, con una temperatura media anual de 10° a 20°C como en algunas zonas del Norte y Centro de México. (51).

Sólo se han encontrado dos localidades libres de esta parasitosis; Saltillo en el estado de Coahuila y Mérida en Yucatán, por lo que se puede decir que prácticamente la parasitosis es común en todo el país.

Fasciola hepatica fue el primer tremátodo descrito, en 1379 por De Brie, Ga bucinus lo identificó en el hígado de borregos y cabras en 1547. El primer caso en humanos fue registrado por Pallas en 1600 (52). El ciclo de vida completo fue también el primero que se dilucidó para un tremátodo digéneo por Leuckart en 1882 y de manera independiente por Thomas en 1883 (28).

Taxonomía

De acuerdo con Soulsby (59), Pantelouris (55), Yamaguti (64) y Nájera (51), la posición taxonómica de Fasciola hepatica, L 1758 es la siguiente:

Phylum	Platyhelminthes	Gegenbaur	1859
Clase	Trematoda	Rudolphi	1808
Orden	Digenea	Van Beneden	1858
Suborden	Prosostomata	Odhner	1905
Superfamilia	Echinostomatoidea	Railliet	1895
Familia	Fasciolidae	(Linnaeus 1758)	Railliet 1895
Género	Fasciola	Linnaeus	1758
Especie	<u>Fasciola hepatica</u>	Linnaeus	1758

Descripción Morfológica

El parásito adulto mide de 18 a 50 mm de largo por 4 a 14 mm de ancho, el cuerpo es aplanado dorsoventralmente de forma foliácea, la parte anterior del cuerpo es más ancha que la posterior. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas (56).

En el extremo anterior hay una prominencia cefálica, detrás de la cual, el cuerpo se ensancha abruptamente. La ventosa oral se encuentra alrededor de la boca en la prominencia cefálica y un poco más abajo se localiza la ventosa ventral. La boca se comunica con una porción muscular llamada faringe, que a su vez va seguida de un corto esófago que se bifurca para formar los dos amplios ciegos intestinales, los cuales forman extensas ramas secundarias laterales. Fig. 1.

El sistema excretor consiste de una fina trama de pequeños canales excretores, los cuales se ramifican a través de todo el cuerpo y terminan en las células flama. Los desechos nitrogenados son eliminados por las células flama a los canales excretores, los cuales se reúnen formando un solo conducto más amplio, que se abre al exterior a través del poro excretor.

El sistema nervioso consiste de un collar de tejido nervioso que rodea al extremo anterior del aparato digestivo, con tres ganglios sobre él y dos largos cordones nerviosos que se dirigen hacia la parte posterior del cuerpo.

Fasciola hepatica es hermafrodita. Los órganos masculinos consisten en dos testículos que se comunican por medio de los vasos eferentes a una estructura llamada bolsa del cirro, en la cual se encuentra una vesícula seminal donde se almacenan los espermatozoides y el cirro. Existe un solo ovario que se comunica por medio de un oviducto al ootipo del cual sale el canal de Laurer. Las glándulas vitelógenas se ramifican y se extienden a los lados del cuerpo y desembocan al ootipo que está rodeado por la glándula de Mehlis cuya función es proporcionar material para la cubierta del huevo.

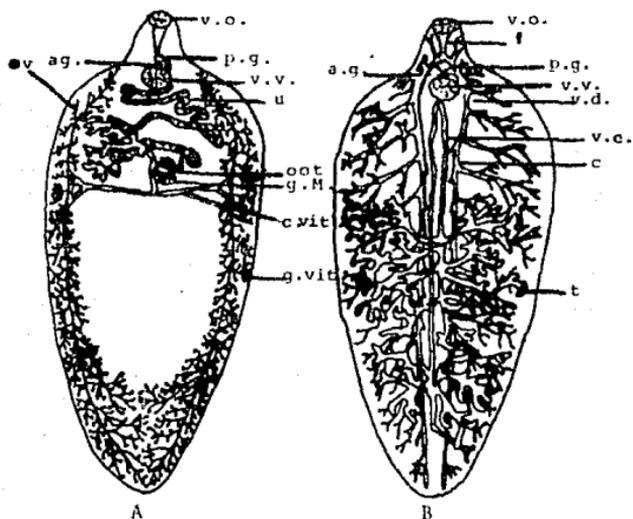


Figura 1. Esquema morfológico de Fasciola hepatica adulta. A. Organos reproductores femeninos, vista ventral; B. órganos reproductores masculinos y aparato digestivo, vista ventral.

c., ciegos; a. g., atrio genital; g.M., glándula de Mehlis; oot., ootipo; v.o., ventosa oral; ov., ovario; f., faringe, t., testículos, u., útero; g.vit., glándula vitelina; c.vit., conducto vitelino.

Tomado de Brown, 1977.

Los óvulos fecundados se rodean de células vitelinas y la cáscara del huevo se forma en el ootipo, después pasan al útero. Los huevos miden de 130 a 150 por 63 a 90 micras, poseen un opérculo y son amarillentos. (45, 56).

Ciclo de vida

La fasciola adulta se localiza en los conductos biliares del hígado del hospedero y sus huevos son vertidos en la bilis y salen con ella hasta el intestino delgado. Posteriormente pasan al exterior junto con las heces. Del huevo se desarrolla una larva llamada miracidio que puede vivir únicamente en el agua. Si las condiciones ambientales son favorables, el miracidio, se desarrolla en el interior del huevo en nueve días, pero si la temperatura y la humedad no son propicias puede permanecer sin desarrollarse durante meses. (45).

Como el miracidio tiene vida corta, 24 horas o pocos días a bajas temperaturas, busca activamente a su huésped moviéndose por medio de los cilios que cubren su cuerpo. En su parte anterior posee dos manchas oculares que probablemente tengan función fototrópica. En el extremo del miracidio existe una papila protoplasmática que le sirve para penetrar en el hospedero, el cual es un caracol del género Lymnaea.

En México se ha informado que las especies hospederas intermediarias son: L. bulimoides, L. cubensis y L. humilis (30, 44), así como Fossaria (Bakerilymnaea) cubensis, Fossaria (Fossaria) humilis y Pseudosuccinea columnella (19).

La segunda fase larvaria se llama esporocisto, ya no presenta la cubierta ciliar y en su interior se encuentran las células germinales que darán origen a la tercera fase larvaria, llamada redía. Las células germinales del esporocisto pueden dar origen a cinco o más redias y si el abasto de nutrientes es favorable se puede producir una segunda generación de redias. Las células germinales de las redias producen una cuarta larva, la cercaria, que es parecida morfológicamente a la fasciola adulta pero que difiere de ella por su tamaño, su cola y por que carece de órganos reproductores. Las cercarias abandonan a las redias a través de un "poro de nacimiento" y al caracol a través de su abertura respiratoria (47).

Las cercarias nadan libremente en el agua, después se adhieren a las plantas, pierde su cola y se rodea de varias membranas formando un quiste llamado metacercaria que es la forma infectante para el hospedero definitivo.

Una vez en el intestino de los mamíferos, se disuelve la membrana quística y queda libre el joven tremátodo, que penetra activamente a través de la pared

duodenal, migra por la cavidad peritoneal y aproximadamente en dos a dieciocho horas penetra al parénquima hepático por el que vaga de seis a ocho semanas para que finalmente se establezca en los conductos biliares, donde madura y pone huevos que salen con las heces al exterior comenzando nuevamente el ciclo. (56, 45) Fig. 2.

El tiempo que se necesita para completar el desarrollo de F. hepatica desde el huevo hasta el gusano adulto en los conductos biliares es de 11 a 15 semanas.

Desarrollo de Fasciola hepatica en el Hospedero Definitivo.

Durante el recorrido de la joven fasciola a través de la cavidad peritoneal y el parénquima hepático, experimenta cambios morfológicos y fisiológicos. Dawes, 1962 (21) observó al infectar ratones, que a partir del primer día postinfección, comienzan a desarrollarse los testículos, el ovario empieza a adquirir forma al octavo día.

Los huevos pueden observarse en el útero del trematodo a los 37 días postinfección, que es cuando aparecen huevos en las heces del ratón.

El aparato digestivo se desarrolla considerablemente durante la migración, las células del intestino de las fasciolas jóvenes, poseen originalmente una función secretora y son morfológicamente distintas a las del adulto. Sus secreciones son líticas y se emplean tanto en el momento del desenquistamiento como en el desplazamiento dentro del hospedero (11, 33, 10).

Cuando el gusano emigrante penetra la cápsula hepática, las células intestinales adquieren la morfología del adulto, e inician sus funciones de absorción y secreción. (11).

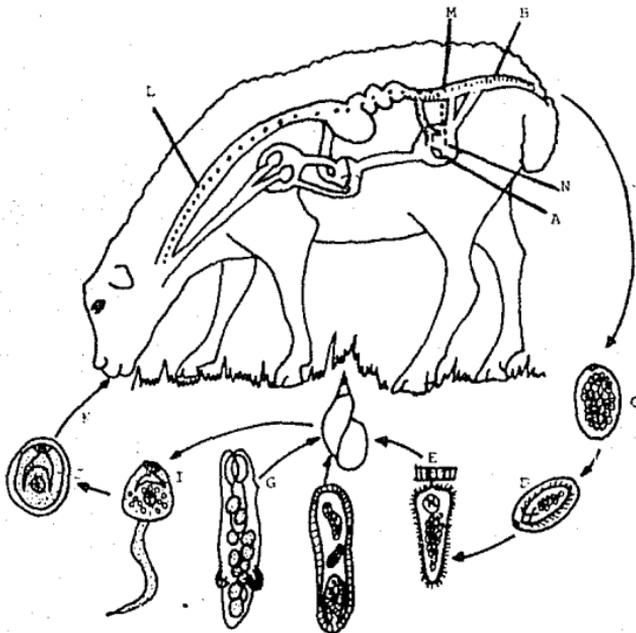
Entre los cambios más importantes en la relación hésped parásito, están las alteraciones en el glucocálix o tegumento externo del parásito. El tegumento está compuesto de una superficie sincitial anucleada, unida tanto opical como basalmente, por medio de túbulos, a células tegumentarias subyacentes que son las productoras de tegumento del parásito (11, 42, 35).

Las formas juveniles recién desenquistadas, tienen un solo tipo de células tegumentarias, que se denominan células T0 (11, 33, 36) que secretan el gránulo T0. Fig. 3.

Durante la emigración al hígado, las células T0 se transforman en células T1 que secretan gránulos T1. Las células T2 del adulto provienen de células embrio-

Figura 2

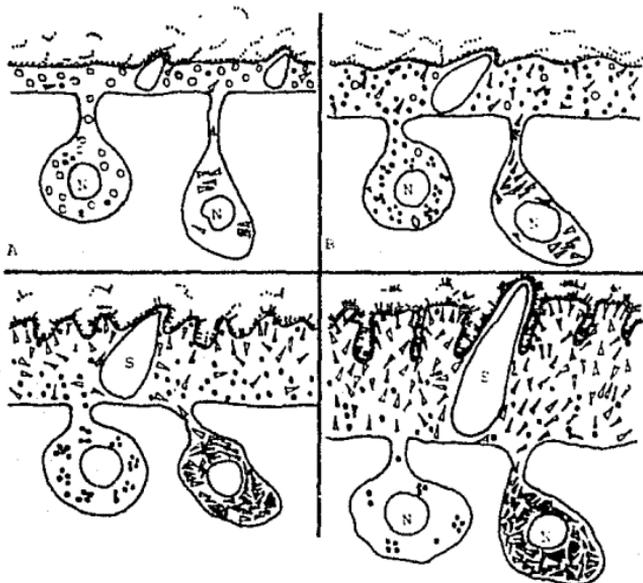
Ciclo vital de Fasciola hepatica



A: F. hepatica adulta en conducto biliar; B: Huevecillo en heces; C: Huevecillo en medio hídrico; D: Huevecillo embriornado; E: Miracidio; F: Esporocisto; G: Redia; H: Caracol huésped intermediario; I: Cercaria; J: Metacercaria; K: In festación por vía oral; L: Metacercaria en aparato digestivo; M: Forma juvenil recién desenquistada; N: Forma juvenil enigrante. Tomado de Majovko, V. y Makarov, P., 1981.

Figura 3

Modificaciones de las estructuras celulares y de algunos antígenos del tegumento de la Fasciola hepatica durante su desarrollo en el huésped.



○● Cuerpos T₀

~ Antígeno de superficie T_{0/1}

~ Antígeno de superficie T₂

●●● Cuerpos T₁

~ Antígenos T₂

N: Núcleo de la célula tegumental

E: Espina

A: Parásito de 1 semana entrando al parénquima hepático.

B: Parásito de 3 semanas emigrando en el parénquima hepático.

C: Parásito de 5 semanas entrando a los conductos biliares.

D: Parásito de 12 semanas, establecido en los conductos biliares.

narias diferentes y liberan los gránulos T2 hacia la superficie hasta que la fasciola se encuentra en los conductos biliares (12).

Los gránulos T0 y T1 son antigénicamente similares entre sí, pero son diferentes a los gránulos T2 del adulto (34, 36). Este ocultamiento se acelera en presencia de anticuerpos específicos (35). Cuando el parásito ha madurado disminuye la velocidad de recambio de la membrana; esto se atribuye a que los conductos biliares ofrecen un ambiente inmunológicamente seguro al gusano adulto (34). Esto provoca un cambio en la composición del glucocálix de gránulos T1 a gránulos T2.

Efectos en el hospedero

Durante su viaje del intestino al hígado, las fasciolas pueden causar hemorragias en los tejidos que atraviesan, es posible apreciar trayectos de la perforación del intestino y de la cápsula hepática. El hígado, donde se observan focos hemorrágicos de hasta 3 mm., sufre un aumento de volumen y presenta el cuadro de una hepatitis traumática hemorrágica. Los orificios de perforación son pequeños con bordes netos, que conducen a trayectos y espacios irregulares ocupados por las fasciolas jóvenes. Estas se alimentan de restos tisulares.

El tejido hepático es irritado por las espinas de la superficie de las fasciolas produciendo inflamación y muerte en las células hepáticas. En este proceso también participan productos metabólicos tóxicos del parásito.

Debido a la acción traumática y a la proliferación bacteriana, se presentan focos de supuración que pueden causar procesos purulentos, lo que aunado al daño de la cápsula hepática puede provocar peritonitis.

Estos daños pueden disminuir la resistencia de este órgano a la infección por bacterias. Por ejemplo el hígado puede infectarse con el bacilo Clostridium oedematiensis el cual no es patógeno cuando el organismo está sano, pero en un animal con fasciolosis estos microorganismos proliferan y producen toxinas que ocasionan la llamada enfermedad negra (45).

Además de nutrirse de sangre y restos de tejido hepático las fasciolas también se nutren de bilis, provocando no sólo una disminución de la cantidad de bilis, sino también alteraciones en su composición gracias a la acción de los productos de excreción y secreción del parásito. Esto origina trastornos en la digestión de los alimentos (Síndrome de mala absorción).

Los síndromes clínicos de la fasciolosis se presentan en tres formas: La fasciolosis aguda, la subaguda y la fasciolosis crónica (15, 62). El que se presen-

te una u otra forma de fasciolosis está dado principalmente por el número de fasciolas que parasitan el hígado.

La fasciolosis aguda se desarrolla rápidamente y puede aparecer en animales en buena condición aparente. Puede matar a los animales en unos cuantos días. Los signos clínicos que se pueden apreciar son somnolencia, debilidad, disnea, ascitis, dolor abdominal, palidez de las mucosas, anemia normocítica normocrónica, hipoalbuminemia, no hay reticulocitosis, ni huevos en heces, se presenta un hígado agrandado y hemorrágico donde es posible encontrar de 800 a 1500 gusanos de los cuales 60% o más están inmaduros. La duración de la enfermedad es de uno a dos días.

La infección subaguda se caracteriza por pérdida de peso, edema submandibular, ascitis, palidez de las mucosas, anemia hipocrómica macrocítica, hipoalbuminemia, reticulocitosis, salida de huevos en heces, un hígado agrandado y hemorrágico con 500 a 1500 gusanos de los cuales la mitad son adultos. Su duración es de una a dos semanas.

La fasciolosis crónica resulta de la ingestión constante de metacercarias en el ganado, se desarrolla a partir de brotes sucesivos de cercarias ingeridas por el hospedero. Aparece sólo cuando un número suficiente de fasciolas ha llegado a establecerse en el hígado. Se manifiesta por la pérdida progresiva de peso, edema submandibular, ascitis, anemia hipocrómica macrocítica, hipoalbuminemia, reticulocitosis, salida de huevos en heces y un hígado cirrótico con conductos biliares engrosados. Su duración es de al menos varias semanas.

Importancia económica y manejo

Los efectos económicos de la fasciolosis son muy notorios en los países donde la ganadería ocupa un lugar importante en la economía. En Australia donde la ganadería ovina es primordial en la economía nacional, la fasciolosis causó pérdidas cercanas a 20 millones de dólares en 1976. (22).

En Puerto Rico la merma por decomiso de hígado a causa de esta parasitosis alcanzó un millón de dólares en 1981. (48).

En Irlanda la fasciolosis causó a la industria pecuaria daños por 10 millones de libras esterlinas anuales y en Inglaterra por 50 millones (48).

En México las pérdidas ocasionadas por este parásito durante 1980 en la ganadería ascendieron a 3840 millones de pesos (17).

Los datos anteriores sólo nos proporcionan un panorama general del impacto económico como consecuencia de esta parasitosis. Actualmente es difícil asignar una cifra concreta al impacto económico provocado por la fasciolosis.

La importancia de los perjuicios económicos causados por las fasciolosis dependen de la intensidad de la infestación. Las pérdidas económicas pueden dividirse en directas o indirectas. Se considera como pérdida directa la muerte del animal parasitado y como indirecta la que resulta de una acción menos severa, pero no menos importante del parásito sobre el ganado como son: baja producción zootécnica, decomiso de hígados en los rastros, abortos con los consecuentes trastornos reproductivos, mayor consumo de alimentos debido a la mala digestión del mismo, pérdida de peso, elevada susceptibilidad a otras enfermedades. Por todo esto se considera que las pérdidas indirectas tienen mayor importancia para el ganadero. (56).

Se pueden considerar tres estrategias para el manejo de esta parasitosis:

a) La reducción de parásitos en el hospedero y de la contaminación de pastos con huevos por medio de tratamientos antihelmínticos sistemáticos.

b) Reducción del número de hospederos intermediarios por medios físicos, químicos y biológicos. Los procedimientos físicos que se han utilizado son: el cercado de lugares encharcados y la creación de sistemas de drenaje por medio de zanjas para que el agua corra a lugares más bajos para evitar así su encharcamiento y con ello la proliferación de caracoles.

Los métodos químicos han dado buenos resultados para reducir el número de caracoles. Los agentes químicos deben aplicarse estratégicamente antes de la temporada de lluvias o en el agua de riego, pero se debe determinar el grado de contaminación. Los agentes químicos más usados son: sulfato de cobre y pentaclorofenato. (56).

La depredación de caracoles que realizan los patos y otras aves acuáticas, así como algunos peces malacófagos, ayudan a reducir la población de hospederos intermediarios, pero no a su erradicación.

c) El manejo mediante medidas zootécnicas consiste en aplicar normas recomendadas que ayudan a reducir las posibilidades de infección. Por ejemplo la rotación de praderas y la aplicación de fasciolicidas en el momento de cambio de potrero, así como la construcción de bebederos adecuados con los que se evite la contaminación con heces.

Inmunidad

La inmunidad contra Fasciola hepatica es muy complicada, debido al tamaño del parásito, su ciclo de vida, su complejidad antigénica, etc. Sin embargo las especies presentan distintos grados de resistencia a esta parasitosis. Los ovinos, los equinos, ratones y cuyos, presentan menor resistencia que los bovinos, humanos y ratas y a su vez estos últimos son menos resistentes que los cerdos. (16).

La respuesta inmune contra las fasciolas juveniles ocurre a nivel peritoneal donde el eosinófilo tiene un papel importante. Se ha observado en ratas resistentes, en la tercera semana postinfección, altos niveles de IgE séricos y en la cavidad peritoneal e intestino delgado abundancia de células cebadas y eosinófilos. (23).

El papel de la pared intestinal como barrera para el establecimiento de fasciolas jóvenes ha sido muy discutido (57, 38). Pero al parecer no tienen relevancia en la resistencia contra el parásito. (41).

La respuesta inmune contra las fasciolas adultas ocurre a nivel del hígado. Es un hecho notable que hasta el 85% de la población de fasciolas adultas es expulsado entre las semanas 16 y 30 postinfección en bovinos. Esta autocuración es precedida por un período de cuatro a seis semanas de actividad biológica reducida de los parásitos, que se manifiesta por una disminución en el número de huevos eliminados en las heces; durante esta fase la expulsión aparecen células plasmáticas, linfocitos, macrófagos, eosinófilos, células cebadas y leucocitos globulares en la mucosa de los conductos biliares. (62). En la bilis de bovinos infectados una sola vez por F. hepatica, números grandes de células plasmáticas productoras de IgA están presentes pero después de la segunda infección las células predominantes son las productoras de IgG1. (29).

Durante el tiempo en que los parásitos están siendo expulsados, hay un aumento en el nivel de anticuerpos reagínicos en los que el agente responsable es la IgE (62). Se piensa que la calcificación de los conductos biliares, como ocurre en bovinos, sea una especie de barrera mecánica contra las fasciolas (20), de ahí que los bovinos sean más resistentes que los ovinos; sin embargo, esta diferencia no se debe solamente a la calcificación, puesto que ésta aparece después de que se manifiestan los mecanismos inmunológicos.

La respuesta inmune en bovinos se manifiesta por la reducción del promedio de parásitos que se establecen en el hospedero, lo que retarda e inhibe el desa-

rrollo de F. hepatica y suprime la producción de huevos, eliminando así a los pa-
rásitos. (62).

Por otro lado, en la fasciolosis operan mecanismos de evasión que son respon-
sables de la permanencia prolongada del parásito, en especial en ovinos, en los
que se ha informado la recuperación de los parásitos de 8 a 11 años después de la
infección única. (45).

Se ha encontrado que Fasciola hepatica reduce las respuestas a los eritroc-
tos de carnero en las ratas (32). Por otra parte se ha informado que F. hepatica
libera una enzima proteolítica, la cual fragmenta a las inmunoglobulinas del hos-
pedero. La enzima tiene in vitro una actividad similar a la de la papaína o catep-
sina B sobre las inmunoglobulinas del ratón, rata, conejo y borrego. (18). Por
otra parte se ha registrado que las fasciolas liberan una gran cantidad de anti-
genos que se unen a los anticuerpos disponibles y ha sido posible demostrar la
presencia de complejos inmunes en ovinos con fasciolas. (2).

Otra forma de evasión de la respuesta inmune en la fasciolosis, es la varia-
ción de antígenos de tegumento que ya fue mencionada anteriormente. Cuando las
fasciolas juveniles son expuestas in vitro al suero inmune del hospedero, las fas-
ciolas quedan cubiertas con IgG, pero el tegumento es sustituido poco a poco al
ir desarrollándose la duela joven. (24).

Ben-Ismael, R. et al., 1979 registra la existencia de una antigenicidad com-
partida entre F. hepatica y el hospedero, por lo que algunos antígenos de Fascio-
la hepatica no son reconocidos tan fácilmente por el sistema inmune. (9).

Antígenos

Es muy importante para obtener una buena prueba de diagnóstico, la obtención de
una preparación antigénica adecuada. Fasciola hepatica es un organismo complejo
que expone al hospedero un buen número de componentes antigénicos, estos son di-
ferentes entre sí, por lo que se dice que F. hepatica es un verdadero mosaico an-
tigénico. (5). Cada estado de desarrollo puede presentar antígenos característi-
cos de esa fase del desarrollo y al mismo tiempo antígenos comunes a los demás
estadios de su ciclo de vida. Esto complica el aislamiento del antígeno apropia-
do, además de que no es fácil obtener a los organismos de cada estadio de desa-
rrollo.

Yoshihara, et al., 1981 (65), utilizando un antisuero con extractos de fas-

ciolas adultas, mediante la prueba de difusión en gel de agar, logró determinar la presencia de antígenos comunes entre los extractos de fasciolas adultas, formas juveniles y metacercarias.

Se han hecho numerosas investigaciones referentes al aislamiento, purificación y caracterización de antígenos con el fin de obtener preparaciones antigénicas confiables para el diagnóstico.

Muchos de los antígenos utilizados en las diferentes técnicas provienen de parásitos adultos, porque pueden obtenerse en mayores cantidades. Entre los antígenos más utilizados para el diagnóstico de la fasciolosis están:

a) Ag somático (AS) es un extracto salino obtenido por homogenización de las fasciolas lavadas en solución salada amortiguadora de fosfatos.

b) Ag somático deslipidizado (ASD) es igual al anterior excepto que al final se hace una extracción con acetona para eliminar los lípidos y de esta manera obtener un antígeno más puro.

c) Ag metabólico o de excreciones y secreciones (AM), se obtiene manteniendo las fasciolas vivas en medio de Hedon-Fleig por 18 horas. Posteriormente este medio se centrifuga y si es necesario se concentra. (6).

Como en la preparación del AS se emplean fasciolas con todo su contenido celular, cabe esperar que los componentes del AM estén también en el AS, sin embargo las diferentes técnicas inmunológicas resaltan algunas diferencias.

La inmunoelectroforesis nos muestra mayor número de componentes en AS que en AM. También se ha encontrado que ambos antígenos, tienen componentes comunes. Al realizar inmunoelectroforesis con sueros ovinos infectados en forma natural, se observó mayor número de líneas de precipitación con AM que con AS, esto podría deberse a que los animales responden principalmente contra antígenos metabólicos (58).

Van Tiggele, 1978. (62), en su trabajo utilizó diferentes preparaciones antigénicas de F. hepatica y encontró que el AS de fasciolas adultas era el más apropiado para usarse en pruebas inmunodiagnósticas. Sin embargo, en México la experiencia adquirida a través de numerosos trabajos indica que no hay una diferencia marcada en cuanto a los resultados obtenidos usando AM o AS de fasciolas adultas. (8).

Biguet et al., 1965 y Capron et al., 1968; citados en (8) encontraron que

un extracto de fasciola compartía 6 antígenos con Dicrocoelium dendriticum, 5 con Taenia saginata, Paragonimus westermani, Schistosoma mansoni y S. haematobium; 4 con S. japonicum; 3 con Trinchinella spiralis y 2 con Ascaris lumbricoides. De los 25 antígenos del extracto obtenido por estos autores, 6 correspondían a antígenos el hospedador definitivo (bovino) y 4 a antígenos del caracol Lymnaea trunculata (hospedador intermediario). (8).

Al correr los antígenos somático (AS) y metabólico (AM), en la prueba de inmunolectroforesis con sueros de ovino hiperinmunes contra estos antígenos Ruiz-Navarrete, 1987 (58), encontró que el AS forma 6 líneas de precipitación con el suero ovino anti-AS, en tanto que con el suero ovino anti-AM formó 9 líneas. Con el AM observó únicamente 3 líneas de precipitación con el suero anti-AS, pero con el suero anti-AM pudo detectar 10 líneas. Por otra parte, este mismo autor obtuvo el número de componentes presentes en estos antígenos, mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual fue para AS de 29 a 42 bandas según la técnica de tinción y para AM varió de 21 a 23 bandas (58).

Diagnóstico.

El diagnóstico de la fasciolosis aguda sólo se realiza en ovinos: por lo general se hace el diagnóstico a la necropsia para reconocer las lesiones características, aunque también es posible el diagnóstico de laboratorio utilizando métodos bioquímicos y citológicos. Los primeros consisten en la detección de modificaciones humorales debido a lesiones hepáticas, como: aumento de deshidrogenasa glutámica y transaminasa glutámica oxaloacética. Los métodos citológicos incluyen la biopsia hepática y el estudio de lesiones intersticiales (56).

En la forma crónica de la enfermedad el diagnóstico está basado en el hallazgo de huevos de tremátodos en las heces del hospedero, mediante pruebas coproparasitoscópicas que van desde un simple frotis hasta métodos más elaborados, la técnica de sedimentación es la más frecuentemente utilizada. Sin embargo a pesar de su sencillez y especificidad esta técnica sólo es aplicable hasta después de la décima semana postinfección, tiempo en que aparecen los primeros huevos en las heces (56, 26, 3).

Con las pruebas serológicas se logra resolver en buena medida este problema, ya que con algunas técnicas muy sensibles se ha logrado detectar anticuerpos desde la segunda semana postinfección (3). Otra ventaja de estas técnicas es que se

pueden aplicar a un gran número de sueros a la vez, lo que las hace adecuadas para estudios epizootiológicos.

Son numerosas las pruebas que se han utilizado para el diagnóstico serológico de la fasciolosis en rumiantes (Cuadro 1). Estos métodos han sido revisados ampliamente por Van Tiggele 1978 (62) y Bautista 1985 (7). Ha sido difícil concluir cual es el antígeno y la prueba más adecuada para el diagnóstico de la fasciolosis. Esta es una de las razones por las que el inmunodiagnóstico no se realiza a gran escala, y su utilización se limita por el momento a algunos centros de investigación.

A pesar de las ventajas que presentan las pruebas de aglutinación y precipitación para el diagnóstico de fasciolosis, tienen también algunos inconvenientes. Las técnicas de precipitación son específicas, pero su sensibilidad no es alta; las técnicas de aglutinación tienen buenos valores de sensibilidad pero no de especificidad. (62, 3).

Otras técnicas, como la fijación de complemento y la inmunofluorescencia son atractivas pero muy laboriosas.

La técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) fue desarrollada primero para determinar concentraciones de IgG (25) y posteriormente se utilizó para el diagnóstico de enfermedades parasitarias, con buenos resultados, ya que se observó que tiene alta sensibilidad además de ser una prueba rápida para la detección de anticuerpos. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en el diagnóstico de la fasciolosis en el ganado. (27, 66, 63, 39).

Hawkes en 1982 (37) describió una modificación del método llamado Dot-Hybridation, de Kafatos et al., 1979 (40), en donde pequeñas cantidades de anticuerpos monoclonales eran pegadas directamente a membranas de nitrocelulosa. Esta modificación llamada dot-immunobinding fue aplicada a ELISA y se observó que tiene gran versatilidad en cuanto a tipos de antígeno que pueden ser utilizados. (53, 54, 63).

Esta técnica conocida como dot-ELISA (ELISA en mancha) presenta alta sensibilidad, es rápida y más económica que ELISA.

CUADRO 1

PRUEBAS INMUNOLÓGICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE FASCIOLASIS

PRUEBA	REFERENCIAS
PRUEBAS SEROLÓGICAS	
1. De inmunodifusión	
a) Difusión Doble (DD) en agar en dos dimensiones. (Ouchterlony)	Tiggele (1978), Everall (1970)
b) Difusión Doble en agar (DD) en una dimensión.	Doyle (1973a)
2. De electroforesis	
a) Inmunolectroforesis (IE)	Capron <i>et al.</i> , (1964)
b) Contraelectroforesis (CIE)	Hillyer (1975)
3. De aglutinación	
a) Hemaglutinación pasiva (HP)	Robert <i>et al.</i> , (1980), Arriaga, <i>et al.</i> , (1983).
b) Con partículas de latex	Bénex (1964)
c) Floculación con bentonita	Kagan (1980)
4. Fijación del complemento (FC)	Bénex, Lamy y Gledel (1959) Kagan (1980).
5. De inmunofluorescencia	
a) Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	Courdet <i>et al.</i> , (1967), Hanna (1980).
b) Prueba de anticuerpos fluorescentes con antígeno soluble (SAFA)	Deelder (1973)
6. Pruebas inmunoenzimáticas	
a) Enzima-inmunoensayo (ELISA)	Burden y Hammet (1978), Farrell <i>et al.</i> , (1981), Levine, Flores y Hillyer (1980), Zimmerman, <i>et al.</i> , (1982).
b) Prueba del antígeno adherido a esferas (DASS)	Deelder y Ploem (1975)
7. Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	Gómez, Morilla y Arriaga, (1979) Arriaga <i>et al.</i> , (1983), Garay, (1983).
PRUEBAS CUTÁNEAS	
1. Intradermorreacción (IDR)	Biagi, Tay y Portilla (1958), Patnaik y Dos (1960), Quiróz, Herrera y Fernández (1973), Lebrija <i>et al.</i> , (1981).
2. Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA)	Doyle (1973b)

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es la adaptación de la técnica dot-ELISA para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, así como realizar una comparación entre ésta y otras dos técnicas: la hemaglutinación pasiva y el inmunoensayo en capa delgada en cuanto a sensibilidad y especificidad.

MATERIAL Y METODOS

Diseño Experimental

Para establecer la prueba de diagnóstico, se utilizaron 14 borregos raza Tabasco, libres de fasciola, provenientes de Mérida, Yucatán, por ser ésta una zona libre de esta parasitosis. Esto se comprobó al no encontrar huevos en heces.

A estos animales se les administraron 200 metacercarias por vía oral. Se comprobó la infección realizando exámenes coproparasitológicos, los cuales resultaron positivos en la semana 11. A este grupo de animales se les tomó muestras de sangre en la semana 20 postinfección.

Otro grupo de 30 borregos se mantuvo libre de fasciola y se utilizaron como animales testigos. Se realizó un estudio de campo con 17 borregos raza Suffolk infectados naturalmente, provenientes de Tulancingo, Hgo., que es una zona de fasciolosis, en estos animales se comprobó también la parasitosis por medio de estudios coproparasitológicos. Para estudios serológicos se les tomó muestra de sangre a todos los animales.

Antígenos

Se obtuvieron dos tipos de antígenos a partir de fasciolas adultas, uno de ellos conocido como antígeno somático (AS) y el otro antígeno metabólico (AM). (6). El primero se preparó obteniendo fasciolas de hígados infectados de rumiantes. Los parásitos se lavaron cuidadosamente con solución salina hasta que el sobrenadante se mostró transparente. Se lavó una vez más con agua destilada y se congelaron a -70°C . Después de congelados los parásitos se liofilizaron (liofilizador Virtis) para posteriormente triturarlos en un mortero colocado sobre hielo. El polvo resultante se lavó con acetona fría, 10 gr., se resuspendieron en PBS pH 7.2 dejándolos en agitación lenta durante 24 horas a 4°C . El sobrenadante se filtró utilizando una membrana con poro de 0.22 μ (Millipore), se le colectó en un tubo de ensayo estéril, se tomó una muestra para la cuantificación de proteínas y se guardó en pequeñas fracciones a -70°C hasta su uso posterior.

El antígeno metabólico (AM) se obtuvo lavando exhaustivamente las fasciolas en PBS pH 7.2 estéril. Posteriormente se dejaron las fasciolas durante 10 minutos en PBS pH 7.2 con merthiolate (tímerosal) en una proporción de 1:10 000. Después de lavarlas se colocaron en un matraz estéril que contenía solución Hedon-Fleig estéril, a razón de 1 ml por fasciola y se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C en baño María. Se colectó el sobrenadante en baño de hielo y se centrifugó por 20 minutos a 8000 rpm en una centrifuga refrigerada. Se determinó el contenido de proteína y se guardó en pequeñas fracciones, a -70°C .

Se determinó la concentración de proteína de las preparaciones antigénicas mediante el método de Lowry (46) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Pruebas serológicas

A los sueros de los borregos utilizados en este trabajo, se les hicieron las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP) e inmunoensayo en capa delgada (ICD) por ser

éstas, dos de las técnicas más frecuentemente utilizadas en el diagnóstico de la fascioliasis, ya que sus valores de especificidad y sensibilidad son aceptables. (3).

Hemaglutinación pasiva (6)

Esta prueba se llevó a cabo con glóbulos rojos de borrego. Después de ser lavados y centrifugados se preparó una suspensión al 2.5% en PBS pH 7.2 los glóbulos rojos se "tanizaron" al mezclar con un volumen igual de solución de ácido tánico 1:20 000, para sensibilizar los glóbulos rojos tanizados se agregó un volumen igual de una dilución óptima de antígeno metabólico en PBS pH 6.4. A diluciones dobles seriadas del suero a probar previamente descomplementado, se le agregaron 25 ul de eritrocitos sensibilizados. Se consideraron positivos los sueros que aglutinaron a una dilución de 1:32 o mayor.

Inmunoensayo en capa delgada (6,31)

Los antígenos de Fasciola hepatica como los de muchos otros parásitos, tienen la propiedad de poder adsorberse firmemente a superficies de poliestireno (plástico) formando una capa homogénea que conserva su actividad serológica. Sobre éstas se colocan diluciones dobles de los sueros a probar, la reacción puede ser visible por la formación de gotas al exponer la superficie al vapor.

La condensación del agua en la reacción antígeno-anticuerpo se debe a la formación de complejos proteínicos hidrofílicos de tamaño mayor a los que se forman en la superficie de plástico en los que sólo hay antígenos.

Se consideraron positivos los sueros que formaron gotas visibles de condensación a una dilución de 1:32 o mayor. El antígeno que se utilizó para llevar a cabo esta prueba fue el metabólico.

DOT-ELISA

Preparación de IgG de conejo anti-IgG de ovino.

Primero se obtuvieron las IgG de ovino, para ello se precipitaron las gama-globulinas de ovino a partir de suero hiperinmune, con una solución saturada de sulfato de amonio al 50%. Después de equilibrar la muestra con solución amortiguadora de fosfatos 0.03 M pH 7.6 y determinar su contenido de proteína, se corrió la

muestra en una columna DEAE-celulosa (2.0 x 30 cms.), equilibrada con el mismo amortiguador. Se separaron las fracciones y se reunieron aquellas que presentaron una absorbancia mayor de 1 a 280 nm.

Posteriormente con la IgG de ovino obtenida, se inmunizaron conejos según el método utilizado por Bautista y Morilla (6).

Para obtener las IgG del suero de conejo hiperinmune, se procedió del mismo modo que se utilizó en la obtención de la IgG ovina, sólo que en este caso se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M pH 7.2 para equilibrar la columna. Se obtuvieron 77 mg/ml de IgG de conejo anti-IgG de ovino y se ajustaron a 5 mg/ml para su uso en la elaboración del conjugado.

Determinación de la actividad de la peroxidasa (Sigma Chem. Co. Assay data sheet). La enzima utilizada fue Peroxidasa (horseradish Tipo VI). Para verificar la actividad de la enzima se preparó la reacción siguiente a 20°C:

2.0 ml de pirogalol al 5% (preparado recientemente en agua)

1.0 ml de H_2O_2 0.147 M (preparado recientemente diluyendo 1.67 ml de H_2O_2 al 30% en 100 ml de agua)

2.0 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.0, 0.1 M, 14 ml de agua.

Se añadió 1 ml de solución de peroxidasa que contenía 0.0222 mg enzima/ml equivalente a 6 unidades de purpurogalina/ml fosfatos 0.1 M, pH 6.0.

Después de 20 segundos exactos a 20°C se añadió 1 ml de H_2SO_4 2N para detener la reacción.

Se extrajo cinco veces con porciones de 10 ml de éter. Se diluyeron los extractos etéreos combinados, a 100 ml con éter.

Se anotó la densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro a 420 nm usando éter como referencia. Todo este proceso fue repetido cuatro veces. La DO promedio fue de 0.053.

Posteriormente se calculó la actividad con la fórmula:

$$\text{mg purpurogalina/100 ml éter} = \frac{\text{D.O. } 420 \times 8.5}{\text{trayectoria de luz en cm}}$$

$$\text{mg purpurogalina/100 ml éter} = \frac{.053 \times 8.5}{1 \text{ cm}} = 0.4505$$

Unidad por ml de solución de peroxidasa = mg de purpurogalina/100 ml de éter

$$\begin{aligned} \text{Unidades por mg} &= \frac{\text{unidades por ml de sol. de peroxidasa}}{\text{mg de peroxidasa por ml}} \\ \text{Unidades por mg} &= \frac{4.4505 \text{ unidades por ml}}{0.0222 \text{ mg peroxidasa por mg/ml}} = 20.29 \text{ unidades} \end{aligned}$$

La actividad de la enzima bajó 13 veces.

Preparación del Conjugado con peroxidasa (4, 43)

Se disolvieron 10 mg de peroxidasa en 0.2 ml de solución de glutaraldehído al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.8 y se dejó por 18 horas a temperatura ambiente. Después se filtró por Sephadex G25 (columna de 0.9 x 30 cm.) equilibrada con NaCl 0.15 M.

Las fracciones color pardo, se concentraron a 1 ml. Para concentrar se utilizó azúcar pulverizada, posteriormente se dializó con solución salina isotónica.

Se añadió a la solución de peroxidasa 1 ml con 5 mg de IgG, previamente dializada contra NaCl 0.15 M.

Posteriormente se añadió 0.1 ml de solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 1 M pH 9.5 y se incubó por 24 horas a 4°C. Se agregó 1 ml de solución de lisina 1 M pH 7.0 y se dejó reaccionar dos horas. Se dializó contra PBS y se filtró por Millipore de 0.22 u. Posteriormente se añadió un volumen de glicerol y se envasó en pequeñas cantidades a -20°C.

Titulación del Conjugado (53, 54).

Se cortaron círculos de 0.5 cm de diámetro de papel de nitro celulosa (Millipore 0.22 u) y se colocó en cada disco 1 ul de suero ovino inmune, en una fluctuación de concentración de 0.1 a 1.0 mg/ml. El suero ovino tiene un rango de concentración de proteína de 5.81 ± 0.54 gr/100 ml, así se diluyó 1:100 para obtener 0.58 mg/ml.

Se dejó secar el papel para estabilizar la unión en estufa a 56°C por 30 minutos. Una vez que los discos llegaron a temperatura ambiente se colocaron en una placa de microtitulación de fondo plano.

Para obstruir los sitios de unión inespecíficos tanto en los discos como en el plástico de los pozos, se probaron dos soluciones obstructora: BSA al 5% en TBS y Tween 20 al 0.05%. Se agregaron 150 ul de solución obstructora a cada pozo

y se dejó agitando a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de aspirar la solución de obstrucción, se hicieron diluciones dobles de conjugado en solución obstructora, se añadieron 150 ul de dilución por pozo y se dejó agitando a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente se lavó tres veces con Tween 20-TBS al 1%

Preparación del Sustrato. Se disolvieron 5 mg de diaminobenzidina en 10 ml de TBS y se añadieron 100 ul de H_2O_2 al 3%.

Desarrollo del color. Se añadieron 150 ul de sustrato por pozo y se dejaron reaccionar por 30 minutos, después se lavó varias veces con TBS y agua y se dejó secar.

Se consideró como título del conjugado la última dilución en la que se observó claramente la formación de manchas pardas en el sitio donde se aplicó el suero en los discos.

Prueba dot-ELISA

Para poder determinar las condiciones adecuadas para el uso de esta técnica en el diagnóstico de las fasciolosis, fue necesario probar diferentes variantes en algunos pasos de la técnica. Durante esta fase de estandarización se corrieron las pruebas tanto con antígeno somático (AS) como con antígeno metabólico (AM). Después de establecer la técnica y las condiciones óptimas para su uso se probaron los sueros de los animales de Tulancingo, los de Mérida y los testigos.

Sensibilización de discos.

A los discos de nitrocelulosa de 0.5 cm de diámetro se les aplicó 1 ul de una solución de antígeno de Fasciola hepatica, utilizando una jeringa Hamilton. Se probaron dos lotes de antígeno para sensibilizar discos, uno de antígeno somático y otro de antígeno metabólico.

El lote de antígeno somático tenía una concentración proteínica de 22 mg/ml y en la sensibilización de discos se probaron las siguientes diluciones:

0.22 mg/ml; 0.44 mg/ml; 0.73 mg/ml y 1.0 mg/ml.

El lote de antígeno metabólico utilizado tenía una concentración de proteína de 2.8 mg/ml del cual fueron probadas las siguientes diluciones:

0.46 mg/ml; 0.8 mg/ml; 0.9 mg/ml y 1.1 mg/ml.

Obstrucción inespecífica

Para obstruir los sitios de unión inespecíficos se utilizaron tres diferentes soluciones: TBS-Tween 20 al 0.05%; BSA al 5% TBS y una dilución al 5% en TBS de leche descremada en polvo Sveltex.

Se agregaron 150 ul de solución obstructora por pozo y se dejó agitando durante 15 minutos.

Después de aspirar la solución obstructora, a cada pozo se le agregaron 150 ul de diluciones de suero ovino anti-fasciola y se dejó incubando por media hora. Las diluciones se hicieron en solución obstructora.

Se aspiró la solución de anticuerpos y se lavaron los pozos con TBS-Tween 20 al 0.05% con agitación y esto se repitió tres veces.

Posteriormente se agregaron a cada pozo 150 ul de conjugado diluido en solución obstructora y se dejó 30 minutos.

Se lavó nuevamente tres veces con agitación y se procedió a aplicar el sustrato de la enzima. Se probaron como sustrato el 1-cloro-4-Naftol y 3-3 diaminobenzidina.

El cloronaftol se preparó en una solución madre de metanol anhidro de la siguiente manera: se disolvió el cloronaftol en metanol a razón de 3 mg/ml y se almacenó en una botella ámbar en la obscuridad a 4°C. Poco antes de usar esta solución, se prepararon 4 ul de H₂O₂ al 30% disueltos en 100 ml de TBS y se agregaron a 2 ml de solución madre. Se añadieron 50 ul por pozo, y se dejó reaccionar 30 minutos.

La diaminobenzidina como sustrato se disolvió en PBS (5 mg en 10 ml) y se agregaron 100 ul de H₂O₂ al 3% en PBS. Se añadieron por pozo 150 ul de este sustrato, se dejó 20 minutos y posteriormente se lavó con TBS y agua.

Las manchas de los sueros positivos son muy notorias a simple vista y se encontraron únicamente en el sitio del disco donde fue aplicado el antígeno.

Las manchas muy pálidas no se consideraron confiables y la ausencia de manchas se consideró negativa.

Los testigos de la prueba, consistieron en tres discos por placa sin conjugado y tres sin antígeno utilizando un suero hiperinmune.

RESULTADOS

Sensibilización de discos.

Con el antígeno somático los mejores resultados se obtuvieron con la concentración 0.73 mg/ml de proteína, donde las manchas fueron más uniformes y claras con las diferentes diluciones de los antisueros probados.

Al utilizar antígeno metabólico los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones de 0.8 mg/ml y 0.9 mg/ml de proteína. Con la concentración de 1.1 mg/ml se obtuvieron también resultados aceptables aunque la claridad de la mancha no fue como en las concentraciones anteriores.

La mayoría de las manchas en los discos sensibilizados con antígeno metabólico con 0.46 mg/ml de proteína tendían a ser pálidas sobre todo en diluciones altas.

Obstrucción inespecífica

Al obstruir con BSA al 5% en TBS y con la solución de leche en polvo, no siempre se observó claridad en la superficie de los discos donde no se aplicó antígeno; con estas soluciones obstructoras se observó en algunos discos la tendencia a teñirse al color del sustrato, pardo con la diaminobenzidina y azul con el cloronaftol.

La solución que mejores resultados proporcionó para obstruir los espacios libres fue el TBS-Tween 20 al 0.05%.

Primera incubación

Los mejores resultados se observaron al utilizar TBS-Tween 20 al 0.05% para diluir el suero. No se encontró problema al utilizar suero en un intervalo de concentración de proteína entre 0.5 a 1.0 mg/ml.

El tiempo que se utilizó para esta incubación fue media hora.

Segunda incubación

TBS-Tween 20 al 0.5% fue la mejor solución para hacer las diluciones del conjugado. Con 75 ul de la dilución óptima de conjugado por pozo es suficiente para la

reacción con anticuerpos séricos ya unidos al antígeno del disco.

Es importante mantener el conjugado a -20°C antes de ser utilizado.

Sustrato

Al utilizar 1-cloro-4-naftol como sustrato, se observaron las manchas pálidas en la mayoría de los discos; esto contrasta con lo observado con 3-3-diaminobenzidina como sustrato cuyos resultados mostraron manchas pardas en el sitio donde se aplicó el antígeno.

Al utilizar diaminobenzidina, en algunas ocasiones, sobre todo con antígeno muy concentrado o con lavados insuficientes se tendía a manchar de pardo todo el disco.

El efecto anterior también se observó cuando no se preparaba debidamente el sustrato; por lo que es importante pasar bien la cantidad de diaminobenzidina, evitar su hidratación y también evitar su exposición a la luz.

Con la diaminobenzidina se obtienen buenos resultados, pero hay que tener cuidado en su preparación ya que es carcinogénica.

Comparación de las pruebas de dot-ELISA, HP e ICD

a) Animales infectados experimentalmente.

Los resultados obtenidos con animales infectados experimentalmente por vía oral con 200 metacercarias de F. hepatica se encuentran en el cuadro 2, en donde se muestran los valores correspondientes a la última dilución de los sueros, en la cual se observó la reacción antígeno-anticuerpo. Se puede apreciar que las pruebas de HP y de ICD fueron eficientes para diagnosticar la infección ya que todos los sueros tuvieron títulos iguales o mayores a 1:32, que se consideró como valor positivo en estas pruebas.

Con respecto a la prueba de dot-ELISA este lote de animales presentó cierta uniformidad en sus títulos ya que 12 de 14 animales presentaron títulos ya sea de 1:102 400 ó 1:204 800; el título de los dos animales restantes fue de 1:51 200, es decir a una o dos diluciones de diferencia.

CUADRO 2

OVINOS INFECTADOS DE MANERA EXPERIMENTAL

Número de animales	Dot-ELISA	Hemaglutinación pasiva	Inmunoensayo en capa delgada.
1	1:204 800	1:32	1:64
2	1:102 400	1:64	1:128
3	1:102 400	1:128	1:128
4	1:102 400	1:64	1:128
5	1: 51 200	1:128	1:64
6	1:102 400	1:64	1:128
7	1:102 400	1:64	1:64
8	1:204 800	1:64	1:128
9	1:102 400	1:64	1:64
10	1:204 800	1:64	1:128
11	1:204 800	1:64	1:128
12	1: 51 200	1:64	1:64
13	1:204 800	1:64	1:128
14	1:204 800	1:64	1:64
No. de animales	14	14	14
Valor mínimo	1: 51 200	1:32	1:64
Valor máximo	1:204 800	1:128	1:128
Valor promedio	1:138 900	1:70.8	1:100.5
Valor modal	1:102 400 y 1:204 800	1:64	1:128

Títulos obtenidos en las tres pruebas inmunológicas practicadas en la población de ovinos procedentes de Mérida, Yuc., infectados experimentalmente con 200 meta cercarias de Fasciola hepatica, administradas por vía oral. Los valores corresponden a la última dilución de los sueros en la cual se observó la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno utilizado fue el metabólico (AM).

b) Animales infectados de manera natural.

En el cuadro 3 se pueden apreciar los resultados obtenidos con los ovinos infectados de manera natural. Con respecto a la prueba de HP puede notarse que de los 17 animales provenientes de una zona con fasciolosis, los cuales habían mostrado huevos del parásito en las heces, 14 animales fueron positivos a la prueba, en tanto de este mismo lote, 16 animales fueron positivos a la técnica de ICD.

Con la prueba de dot-ELISA fue posible encontrar títulos elevados donde el título mínimo fue 1:25 600 y el valor modal 1:102 400.

c) Ovinos testigo

Con la prueba de HP. Todos los animales de este grupo dieron títulos inferiores o iguales a 1:16, valor que en esta prueba se consideró negativo. En la prueba de ICD fue posible observar la presencia de seis animales positivos con título de 1:32; los 24 animales restantes resultaron negativos con títulos menores o iguales a 1:16. (Cuadro 4).

De este lote de animales los títulos más altos se presentaron con la prueba de dot-ELISA, donde el título promedio fue 1:234, con un título mínimo de 1:40 y un máximo de 1:800.

d) Comparación de los resultados obtenidos en la prueba de dot-ELISA en los tres grupos de animales.

Debido a que la prueba de dot-ELISA proporcionó títulos más elevados que con las otras dos pruebas, en los tres grupos de animales se elaboró el cuadro 5, en el cual se puede apreciar que los animales testigo muestran valores que van desde 1:40 a 1:800, sin embargo los animales infectados ya sea natural o experimentalmente muestran valores que van de 1:25 600 a 1:204 800. De este modo los datos permiten tener un valor de corte que diferencia los animales testigos de los animales infectados.

e) Comparación de los resultados obtenidos con los tres grupos de animales en las diferentes pruebas.

En el cuadro 6 se observan los promedios del inverso de los títulos obtenidos con las diferentes pruebas. Se puede apreciar que tanto en los ovinos infectados de

CUADRO 3

OVINOS INFECTADOS DE MANERA NATURAL

Número de animales	Dot-ELISA	Hemaglutinación pasiva	Inmunoensayo en capa delgada.
1	1:102 400	1:64	1:64
2	1:102 400	1:32	1:64
3	1: 51 200	1:32	1:64
4	1: 51 200	1:32	1:128
5	1:102 400	1:64	1:128
6	1: 25 600	1:16	1:64
7	1:102 400	1:64	1:64
8	1:102 400	1:64	1:64
9	1: 51 200	1:4	1:32
10	1:102 400	1:32	1:128
11	1: 25 600	1:32	1:32
12	1: 25 600	1:16	1:16
13	1:102 400	1:64	1:64
14	1:204 800	1:64	1:32
15	1:102 400	1:32	1:64
16	1: 51 200	1:64	1:32
17	1:102 400	1:64	1:128
No. de animales	17	17	17
Título mínimo	1: 25 600	1:4	1:16
Título máximo	1:204 800	1:64	1:128
Título promedio	1: 82 823	1:43.5	1:68.7
Título modal	1:102 400	1:64	1:64

Títulos obtenidos en las tres pruebas inmunológicas practicadas a la población de ovinos infectados de manera natural provenientes de Tulancingo, Hgo. Los valores registrados son la última dilución de los sueros que originó una reacción antígeno anticuerpo visible. Los datos se obtuvieron usando antígeno metabólico. (AM).

CUADRO 4
OVINOS TESTIGOS

Número de animales	Dot-ELISA	Hemaglutinación pasiva	Inmunoensayo en capa delgada.
1	1:200	1:2	1:8
2	1:400	1:4	1:16
3	1:400	1:4	1:16
4	1:160	1:2	1:16
5	1:320	1:4	1:16
6	1:100	1:2	1:32
7	1:200	1:4	1:16
8	1:200	1:8	1:16
9	1:160	1:2	1:8
10	1:320	1:8	1:4
11	1:80	1:4	1:2
12	1:80	1:2	1:4
13	1:40	1:2	1:32
14	1:80	1:4	1:8
15	1:400	1:8	1:16
16	1:320	1:8	1:16
17	1:100	1:8	1:32
18	1:400	1:16	1:32
19	1:100	1:4	1:16
20	1:400	1:16	1:32
21	1:800	1:16	1:32
22	1:200	1:4	1:4
23	1:320	1:16	1:4
24	1:80	1:8	1:8
25	1:320	1:16	1:4
26	1:100	1:4	1:16
27	1:300	1:4	1:16
28	1:320	1:8	1:16
29	1:80	1:2	1:16
30	1:160	1:4	1:16
Título mínimo	1:40	1:2	1:2
Título máximo	1:800	1:16	1:32
Título promedio	1:234.6	1:6.4	1:15.6
Título modal	1:320	1:4	1:16

Resultados obtenidos en las tres pruebas inmunológicas practicadas en la población de ovinos procedentes de Mérida, Yuc., la cual resultó libre de fasciolosis por examen coproparasitológico y necropsia. Los valores corresponden a la última dilución de los sueros en la cual se observó la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno con que se corrieron estas pruebas fue el antígeno metabólico. (AM).

CUADRO 5

Título	Parasitados de manera natural	Parasitados Experimentalmente	Testigos
1:40			1
1:80			5
1:100			4
1:160			3
1:200			5
1:320			6
1:400			5
1:800			1
1:1500			
1:3000			
1:6000			
1:12000			
1:25600	3	0	
1:51200	4	2	
1:102400	9	6	
1:204800	1	6	
Totales:	17	14	30

Resultados de la prueba dot-ELISA en los tres grupos de animales; parasitados de manera natural, en forma experimental y testigos. Los valores permiten realmente tener un valor de corte que diferencia los animales sanos de los enfermos. El título se refiere a la dilución más alta que origina una reacción positiva.

CUADRO 6

PROMEDIOS DEL INVERSO DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN LAS TRES
PRUEBAS CON LOS TRES GRUPOS DE ANIMALES

	dot-ELISA	Hemaglutinación pasiva	Inmunoensayo en capa delgada.
ovinos infectados en el campo	82 800	43.5	68.7
ovinos infectados experimentalmente	138 900	70.8	100.6
testigos	234.6	6.4	16.2

manera natural como experimentalmente se encuentran títulos más elevados que en los testigos. Por otra parte los testigos, por la prueba de dot-ELISA muestran títulos más elevados que en las otras pruebas, sin embargo, la diferencia en los títulos de los testigos e infectados es muy aparente.

DISCUSION

Por su facilidad para aplicarse en condiciones de campo, ya que es una técnica sencilla, que no requiere equipo especializado, el examen coproparasitológico es la prueba más utilizada en el diagnóstico de la fasciolosis, sin embargo, tiene la limitante de que únicamente es posible obtener resultados positivos una vez que las fasciolas han madurado sexualmente, esto en la octava o novena semana post infección, pero para este tiempo ya se presentan daños hepáticos en el animal hospedero.

Este inconveniente es superado con las pruebas serológicas que son más rápidas, ya que permiten detectar anticuerpos desde la primera semana postinfección, lo que resulta ventajoso para el tratamiento oportuno de los animales antes de que ocurran daños severos al hígado.

También las pruebas serológicas presentan inconvenientes para su uso a gran escala por el diagnóstico de la fasciolosis. Las pruebas no muy sofisticadas como Difusión Doble y Contrainmunolectroforesis son específicas pero su sensibilidad es baja. Las técnicas de aglutinación son sensibles pero su especificidad es baja.

En México, una de la pruebas inmunológicas más comunmente utilizadas para diagnosticar esta enfermedad, por ser una técnica sencilla y por tener aceptable sensibilidad es la Intradermorreacción (3, 26), pero su especificidad es dudosa.

Existen técnicas con valores de especificidad y sensibilidad aceptables como la Inmunofluorescencia indirecta, pero son muy laboriosas, lo que las hace inadecuadas para trabajos de campo (3, 62).

Una de las pruebas que resultó muy atractiva por su alta sensibilidad es ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), esta prueba fue utilizada en el diagnóstico de la fasciolosis por Farrell, 1981 (27), Wescott, 1984 (63), Zimmerman, 1982 (66), y Hillyer, 1985 (39). Con la prueba de ELISA es posible obtener títulos confiables desde la quinta o sexta semana postinfección. En la literatura se menciona que el antígeno que se va a utilizar, después de pasar por un proceso tedioso de solubilización, se deja incubando toda la noche, para que el antígeno sea adsorbido por el plástico de las microplacas. Después de esta incubación, la cantidad de antígeno que quedó pegado al plástico de las microplacas es variable,

dependiendo del tipo de antígeno y de la facilidad de la microplaca para adsorber éste. Esto lógicamente puede repercutir en la sensibilidad de la prueba (53, 54).

El pegar el antígeno directamente en la nitrocelulosa resulta ventajoso desde varios puntos de vista. Por ejemplo la unión proteína antigénica-nitrocelulosa es muy estable, lo que garantiza mantener una concentración constante de antígeno, lo cual se refleja en la sorprendente sensibilidad de dot-ELISA. Pappas, et al., 1984 (54), trabajando con leishmaniasis obtuvo un rango de títulos con ELISA de 1:32 hasta 1:32 768 y con dot-ELISA de 1:512 hasta 1:204 800.

Por otro lado, el uso de discos de nitrocelulosa permite detectar los resultados de la prueba sin necesidad de espectrofotómetro, lo cual puede ser útil en trabajos de campo.

La Hemaglutinación pasiva (HP) y el Inmunoensayo en capa delgada (ICD) son dos técnicas que se han utilizado con regularidad en el diagnóstico de la fasciolosis, detectan anticuerpos desde la segunda o tercera semana postinfección. ICD requiere poco tiempo para llevarse a cabo, esta prueba no es costosa y sus valores de especificidad y sensibilidad son aceptables (3, 6, 27).

HP es más tardada y laboriosa que ICD, también requiere de más equipo y por tanto es más costosa. Sus valores de especificidad y sensibilidad no son muy diferentes a los conseguidos por ICD, en suma se puede afirmar que ésta es una buena técnica de diagnóstico (3, 6, 62).

En este trabajo fue posible demostrar la eficiencia de ICD y HP para diagnosticar fasciolosis en ovinos, ya que en los animales infectados experimentalmente ambas pruebas detectaron a todos los animales como positivos, en tanto que en los animales infectados de manera natural, fue posible detectar con ICD a 16 de los 17 animales de este lote y con HP resultaron positivos 14 de 17 animales. (Cuadro 7).

Respecto a los animales testigos la prueba de HP no detectó falsos positivos, pero con ICD se detectó de este lote de 30 animales a seis ovinos como falsos positivos, lo cual difiere con los resultados obtenidos por Gómez, et al., 1979, (31) y Rufz-Navarrete, 1987 (58).

La prueba de dot-ELISA mejoró en más de 1000 veces la sensibilidad de HP e ICD. (Cuadro 6), además no se encontraron falsos positivos al utilizarla con animales testigos.

CUADRO 7

PROPORCION DE ANIMALES ENCONTRADOS POSITIVOS EN CADA UNA
DE LAS TRES PRUEBAS UTILIZADAS

	Ovinos infectados experimentalmente	Ovinos de Tulancingo	Ovinos libres de Fasciolasis
Dot-ELISA	14/14	17/17	0/30
Hemaglutinación pasiva	14/14	14/17	0/30
I C D	14/14	16/17	6/30

En los cuadros 2, 3 y 4 se puede apreciar la enorme diferencia en sensibilidad. Con los sueros que dieron valores alrededor de 1:128 con HP e ICD, se obtuvieron títulos mayores de 1:25 600 con dot-ELISA. Se puede observar también que los títulos de los animales de Tulancingo y los de los ovinos infectados experimentalmente, no son muy diferentes, aunque hay una tendencia en los valores de los animales experimentales a ser más altos, sólo un ovino de Tulancingo presentó títulos de 1:204 800, en cambio seis ovinos experimentales alcanzaron este título. Por otra parte el título más bajo de los animales parasitados detectado con dot-ELISA (1:25 600) fue de un animal de Tulancingo.

Los títulos de los animales testigos también resultaron mucho más altos con dot-ELISA que con las otras pruebas. Con HP e ICD el título más alto encontrado en los animales testigo fue de 1:32, en cambio con dot-ELISA éstas presentaron un título modal de 1:320. (Cuadro 4).

Debido a la enorme diferencia los títulos más bajos obtenidos con los animales parasitados (1:25 600) y los títulos más altos de los animales testigos (1:800), dot-ELISA no deja de ser específica también a pesar de lo alto de los títulos de los animales negativos, comparados con los obtenidos con las otras pruebas. (Cuadro 5).

Para implementar una técnica de diagnóstico apropiada para detectar una parasitosis se tienen que considerar las diferentes características del parásito, tales como la existencia de diferentes fases de desarrollo, la presencia de antígenos propios de cada estado de desarrollo, así como la presencia de antígenos comunes a todas las fases de desarrollo, cambios en la composición antigénica del tegumento, etc. Fasciola hepática presenta estas características (65, 58, 34, 35, 11, 12). Tomar en cuenta estos factores nos puede ayudar a determinar el tipo de antígeno que se debe utilizar para tener cierta confiabilidad en nuestro diagnóstico.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de antígeno: el antígeno somático (AS) y el antígeno metabólico (AM) ambos de la fase adulta del parásito, debido, por un lado a la facilidad de obtener buenas cantidades de estos antígenos a partir de parásitos colectados en rastros y por otro lado a que los resultados obtenidos con ellos en las diferentes pruebas, según varios autores han sido aceptables (62,7,3,6,8). De modo que para detectar la presencia del parásito, el uso de estos antígenos es confiable, porque si estimulan la producción de anticuer-

pos por parte del hospedero, pero el papel real de la reacción antígeno-anticuerpo en la fasciolosis debe tomarse con cautela, ya que se han registrado diferentes mecanismos de inmunoevasión donde los antígenos de F. hepatica tienen un papel importante. Por ejemplo, el rápido recambio de los antígenos del tegumento de las fasciolas (34, 36, 13, 14), al poner en contacto los gusanos juveniles con el suero inmune del huésped, provoca que las fasciolas se cubran con IgG, que se une al glucocálix externo, posteriormente se presenta recambio del glucocálix que da lugar a la pérdida de estos complejos (24). También existen informes acerca de la presencia de grupos sanguíneos humanos en las fasciolas adultas (9), así como la presencia de componentes séricos del huésped en las fasciolas adultas. Esta antigenicidad compartida dificulta el reconocimiento del parásito por el huésped. Se ha encontrado que Fasciola hepatica produce inmunosupresión, ya que reduce las respuestas a los glóbulos rojos de pollo en el borrego (58). Existen evidencias de la producción de enzimas proteolíticas que destruyen inmunoglobulinas por parte de F. hepatica (50).

También ha sido descrita la liberación de gran cantidad de antígenos del parásito, que posiblemente reaccionen con los anticuerpos disponibles y forman complejos inmunes (62, 2). Ruiz-Navarrete, 1987 (58) al trabajar con la prueba de Inmunoelctrotransferencia con antígeno somático y antígeno metabólico encontró una banda que se manifiesta prominentemente desde la primera semana postinfección y va aumentando con el tiempo. Es posible que este componente antigénico intervenga en las pruebas de diagnóstico, pero la inducción de la respuesta inmune hacia este componente antigénico pudiera ser un mecanismo de inmunoevasión de la respuesta del huésped.

Así observamos que dada la alta complejidad del parásito, sus diferentes componentes desencadenan distintas respuestas de anticuerpos en el animal infectado.

En Medicina Veterinaria, el diagnóstico serológico de una enfermedad se basa en la respuesta del hato, no del individuo, algunos animales responden contra determinados antígenos mientras que otros animales pueden responder contra antígenos diferentes, resulta aparente que, con fines prácticos de diagnóstico sería conveniente utilizar antígenos crudos, como el AS o AM, porque nos permitiría detectar mayor número de animales con anticuerpos anti-fasciola.

Durante la estandarización de la técnica se observaron algunos pasos que pueden ser importantes para el buen desarrollo de esta, como son:

a) La obtención de un buen antígeno; cabe mencionar que también se obtuvieron títulos similares, al llevar a cabo la prueba con antígeno somático pero la calidad y repetibilidad de los resultados fue mejor con el antígeno metabólico.

b) La obtención del conjugado es un paso crucial para el desarrollo de la prueba. Un buen conjugado con un alto título nos garantiza confianza en los resultados. El título de un conjugado y de otro puede variar, sin embargo, nos podemos ajustar a este valor haciendo la dilución adecuada de éste durante la prueba, pero la confianza en cada conjugado sólo se obtiene al elaborarlo, por lo que son muy importantes todos y cada uno de los pasos en la preparación del conjugado.

c) La preparación correcta del sustrato también es importante para la lectura de los resultados. Como ya se mencionó anteriormente con la diaminobenzidina se obtuvo mayor claridad, que con el uso del cloronaftol. La preparación de la diaminobenzidina es delicada; además de que es importante pesar bien, hay que cuidar de que esta no se hidrate, ni que este expuesta a la luz, por lo que conviene mantenerla al vacío, en frasco ámbar y en refrigeración. No debemos olvidar que la diaminobenzidina es carcinogénica por lo que se debe manejar con el cuidado debido.

CONCLUSIONES

Resalta con mucho, la sensibilidad de dot-ELISA, respecto a ICD y HP lo cual la convierte en una técnica atractiva para la detección temprana de esta parasitosis, esto permitiría un tratamiento terapéutico antes de que maduren las fasciolas en los conductos biliares del hospedero.

En cuanto a la especificidad vemos que los valores de algunos animales considerados negativos son altos con dot-ELISA, comparados con los obtenidos con ICD y HP; Esto podría originar sospechas en cuando a la especificidad de esta técnica, pero vemos que la diferencia entre los títulos de los animales testigos y los animales parasitados es muy grande, por lo que se sugiere para eliminar las reacciones inespecíficas, hacer diluciones altas de los sueros, como 1:1 000 o más.

Observamos varias características, que hacen de dot-ELISA una técnica susceptible a ser aplicada en condiciones de campo, como son: no requerir de espectrofotómetro o algún aparato especial para la lectura de los resultados, lo cual

reduce su costo, que comparado con otras técnicas de alta sensibilidad es bajo. Por otra parte se requieren pequeñas cantidades de antígeno y demás reactivos, además los reactivos son estables por mucho tiempo y las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente; se pueden probar muchos sueros simultáneamente y además es posible llevar a cabo esta prueba en tres horas.

Debido a que la unión antígeno-nitrocelulosa es estable durante mucho tiempo se pueden preparar discos ya sensibilizados en grandes cantidades y guardarlos a -70°C hasta su utilización, así pueden permanecer por varias semanas. (53, 54, 67).

El uso de esta prueba puede ser muy amplio gracias a la naturaleza de la unión de la proteína antigénica con la nitrocelulosa, en teoría, con esta técnica se podrán detectar anticuerpos contra cualquier antígeno que se una a la nitrocelulosa y que además estimule la respuesta inmune en animales o humanos.

Mediante diferentes trabajos utilizando diferentes pruebas inmunológicas incluyendo HP e ICD se conoce la dinámica de la respuesta inmune contra la fascioliasis. (5, 7, 15, 51); sería interesante seguir la variación de los títulos de anticuerpos utilizando dot-ELISA ya que por ser una técnica muy sensible, posiblemente se detectarían los animales infectados más tempranamente.

Es cierto que el costo real de esta técnica es menor que el de una técnica de sensibilidad comparable como ELISA estándar o radioinmunoensayo, pero en México, debido a su situación económica, el costo de esta prueba es un factor que influye en el uso de ésta a gran escala por el clínico o por el veterinario, a pesar de las ventajas ya mencionadas; de hecho, casi todas las pruebas serológicas presentan este problema para su uso extensivo con animales. Pero en humanos, en algunos centros de investigación o en clínicas donde se requiera de técnicas con alta sensibilidad, que además requieran poca cantidad de antígeno, como en enfermedades causadas por virus, dot-ELISA podría ser una opción atractiva.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESUMEN

La fasciolosis en el ganado origina pérdidas económicas que son difíciles de cuantificar, pero es una parasitosis importante porque como consecuencia de esta enfermedad se obtiene menos carne, leche, etc., para el consumo humano. En el diagnóstico de esta enfermedad se han utilizado numerosas técnicas, entre éstas, las serológicas son las más atractivas por su rapidez para detectar anticuerpos, y porque sus valores de especificidad y sensibilidad son aceptables. Una de las pruebas de alta sensibilidad que se lleva a cabo para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis es ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Se ha registrado en la literatura una modificación de esta técnica, en la cual el antígeno es pegado a discos de nitrocelulosa en vez de fijarse directamente en el plástico de las microplacas. Esta técnica conocida como dot-ELISA (ELISA en mancha) tiene algunas diferencias con ELISA en placa, por ejemplo al no requerirse equipo especial para leer resultados, resulta más económica, su procedimiento es más sencillo, por lo que su aplicación es posible en condiciones de campo. En este trabajo se establecen las condiciones que requiere la técnica para su utilización en el diagnóstico inmunológico de la fasciolosis en ovinos y además se comparan los resultados con los obtenidos con otras pruebas serológicas como hemaglutinación pasiva (HP) e inmunoensayo en capa delgada (ICD). Se utilizaron 17 ovinos infectados de manera natural con F. hepatica provenientes de Tulancingo, Hgo. y a 14 ovinos libres de F. hepatica provenientes de Mérida, Yuc. Los animales infectados dieron títulos que van de 1:25 600 hasta 1:204 800; mientras que los controles dieron títulos no mayores de 1:800. Los títulos de los animales infectados obtenidos con dot-ELISA fueron más de 1000 veces más altos que los obtenidos con ICD y HP. La diferencia tan grande entre los títulos de los testigos y los ovinos infectados ayuda a discriminar las reacciones inespecíficas ya que estas se pueden eliminar haciendo diluciones de 1:1000 a mayores. Por la alta sensibilidad de la prueba ésta podría ser útil para la detección temprana de esta parasitosis.

LITERATURA CONSULTADA

1. ARMOUR, J. 1975. The epidemiology and control of bovine fascioliasis. *Vet. Res.*, 96:198-201.
2. ARRIAGA DE MORILLA, C., RUIZ-NAVARRETE, A., GOMEZ, A., FRAIRE, M., BAUTISTA, C.R., MORILLA, A., 1984. Detección de Complejos Inmunes en animales infectados con *Fasciola hepatica*. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. S.A.R.H.
3. ARRIAGA DE MORILLA, C. 1985. Diagnóstico Inmunológico de la Fascioliasis en rumiantes. *Parasitología, México*. Vol. 1:134-150.
4. AVRAMEAS, S., 1972. Enzyme markers: Their Linkage with proteins and use in immunochemistry. *Histochem. J.* 4:321-330.
5. BAUTISTA, C.R., 1980. Inmunología en la fascioliasis. Memorias del curso de actualización en Inmunoparasitología Veterinaria. México, pp. 84-89.
6. BAUTISTA, C.R. y MORILLA, A. 1981. Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C., México, D.F.
7. BAUTISTA, C.R. 1985. Respuesta Inmune en fascioliasis. Editado por Quiroz Romero H. y Flores Crespo R. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación Pecuaria en México. En prensa.
8. BAUTISTA GARFIAS, C.R. 1986. Respuesta Inmune en Fascioliasis. Volumen Conmemorativo del Centenario del Descubrimiento del Ciclo de *F. hepatica*. México.
9. BEN-ISMAEL, R., CARME, B., ROUGER, P., GENTILINI, N. et SALOMON, C. 1979. Mise en évidence de substances Lewis dans *Fasciola hepatica*. *C.R. Acad. SC. Paris*, 289:1322.
10. BENNET, C.E. and L.T. THREADGOLD, 1973. Electron microscope studies of *F. hepatica*. XIII. Fine structure of newly excysted juvenile. *Exp. Parasitol.* 34:85-99.

11. BENNET, C.E., 1975a. Fasciola hepatica: Development of caecal epithelium during migration in the mouse. *Exp. Parasitol.* 37:426-441.
12. BENNET, C.E. and L.T. THREADGOLD, 1975b. Fasciola hepatica: Development of tegument during migration in mouse. *Exp. Parasitol.*, 38:38-55.
13. BENNET, C.E., 1978. The identification of soluble adult antigens on the tegumental surface of juvenile F. hepatica. *Parasitology*, 77:325-332.
14. BENNET, C.E., HUGHES and E. HARNESS, 1980. Fasciola hepatica: Changes in tegument during killing of adult surgically transferred to sensitized rats. *Parasite. Immunol.*, 2:39-55.
15. BORAY, J.C., 1967. Studies on experimental infections with F. hepatica, with particular reference to acute fasciolosis in sheep. *Ann. Trop. Parasitol.*, 61:439-450.
16. BORAY, J.C. 1969. Experimental fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology*. 7. Ed. Ben Dawes. A.C. Press. 95-140.
17. BULL. OFF. INT. EPIZ., 1981. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. 93:903.
18. CHAPMAN, C.B. and MITCHELL, G.F. 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by Fasciola hepatica. *Vet. Parasitol.*, II: 165.
19. CRUZ REYES, A. 1985. Aspectos malacológicos de la fasciolosis. Volumen Conmemorativo del 25º Aniversario de la Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C.
20. DARGIE, J.D., ARMOUR, J., RUSHTON, B. and MURRAY, M., 1974. Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fasciolosis. In: E. J.L. Soulsby (ed). Parasitic Zoonosis, Academic Press. Inc., New York., 249.
21. DAWES, B. 1969. Citado por Reddington, J.J., R.W. Leid y R.B. Wescott. 1984. A review of the antigens of F. hepatica. *Vet. Parasitol.*, 14:209-229.
22. DE HARO, A.I., TAY, Z.J. y SALAZAR, S.P. 1982. Estado actual de nuestros conocimientos sobre fasciolosis en México. Zoonosis Parasitarias. *Fac. Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M.* pp. 73.
23. DOY, T.C., D.L. HUGHES and E. HARNESS, 1978. Resistance of the rat to reinfection with F. hepatica and the possible involvement of intestinal eosinophil leukocytes. *Res. Vet. Sci.*, 25:41-44.

24. DUFFUS, W.P.H. and FRANKS, D., 1980. In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile Fasciola hepatica. Clin. Exp. Immunol. 41:430.
25. ENGAVALL, E. and PERLMANN, P., 1972. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol., 109:129-135.
26. ENRIQUEZ A.S., 1971. Evaluación de la prueba intradérmica y examen coproparasitológico en el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. Tesis F.M.V.Z., U.N.A.M. México.
27. FARRELL, J. SHENN, D., WESCOTT, B., LANG, B., 1981. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of F. hepatica. Infection in Cattle. Am. J. Vet. Res. 42:237-240.
28. FAUST, E.C., P.F. RUSSELL y D.R. LINCICOME, 1961. Parasitología Clínica de Craig y Faust. Segunda Edición en español. U.T.E.H.A., México.
29. FLAGSTAD, T. and ERICKSEN, L., 1974. Hepatic Immunoglobulin synthesis in Fasciola hepatica infected calves Res. Vet. Sci. 17-59.
30. GOMEZ-AGUDELO, T., R. PEREZ-REYES y F. ZERON-BRAVO, 1978. Fasciolas en México. Estado actual y huéspedes intermediarios. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 20:121-127.
31. GOMEZ, A., C. ARRIAGA y A. MORILLA. 1979. Evaluación preliminar de la prueba de Inmunoensayo en Capa Delgada para el diagnóstico serológico de la fasciolosis en rumiantes. Vet. Méx. 10:181-186.
32. GOOSE, J., 1976. On the persistence of Fasciola hepatica in rats resistant to reinfection. Parasitol., 73:XXVI.
33. HANNA, R.E.B. and L.T. THREADGOLD, 1975. Development of an "In vitro" technique for cytological investigations of slices of F. hepatica: Evaluation by morphological criteria. Int. J. for Parasitol., 5:321-331.
34. HANNA, R.E.B., 1979. Surface antigenicity of Fasciola hepatica during development. British. Soc. Parasitol., Parasitology 79:XXXI.
35. HANNA, R.E.B., 1980a. Fasciola hepatica: glycocalix replacement in the juvenile as a possible mechanisms for protection against host immunity, Exp. Parasitol., 50:103-114.

36. HANNA, R.E.B., 1980b Fasciola hepatica: Immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. Exp. Parasitol., 50:155-170.
37. HAWKES, R., NIDAY, E. and GORDON, J. 1982. A dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and other Antibodies. Analyt. Biochem. 119:142-147.
38. HAYES, T.J. and M. MITROVIC. 1977. The Early expression of protective immunity to Fasciola hepatica in rats. J. Parasitol. 63:585-587.
39. HILLYER, G.V., Z. SANCHEZ and DELFIN DE LEON. 1985. Immunodiagnosis of bovine fascioliasis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Immunoprecipitation Methods. Journal of Parasitology. Vol. 71:4.
40. KAFATOS, F.C., JONES, C.W., et al., 1979. Nucl. Acid. Res. Citado por Hawkes, R. et al., 1982. 7:1541-1552.
41. KELLY, J.D., N.J. CAMPBELL and J.K. DINEEN, 1988. The role of the gut in acquired resistance to Fasciola hepatica in the rat Vet. Parasitol., 6:359-367.
42. KØIE, M., P. NANSEN and N.O. CHRISTENSEN, 1977. Stereoscopical studies of rediae, cercariae, cyst, excysted metacercariae and migratory stages of F. hepatica. Z. Parasitenk 54:289-297.
43. KUHLMANN, W.D., S. AVRAMEAS and T. TERNYNK, 1974. A Comparative study for ultrastructural localization of intracellular immunoglobulins using peroxidase conjugates. J. Immunol. Methc., 5:33-48.
44. LANDEROS, M. A., F. IBARRA, J.L. ESCUDERO Y F. MILIAN, 1981. Determinación de algunos hospederos intermediarios de F. hepatica en la cuenca lechera de Tulancingo, Hgo. Tec. Pec. Méx., 40:47-51.
45. LAPAGE, G. 1971. Parasitología Veterinaria. C.E.C.S.A. México, pp 235-241.
46. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R. J. RANDALL, 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 28:328.
47. MAJOVKO, V.V., P.V. MAKAROV. 1981. Biología General. Tercera Ed. Editorial Grijalvo, México. pp 228-293.
48. MILIAN, S.F. 1986. Pronóstico Médico y Económico. Fascioliasis. Vol. Conmemorativo del Centenario del Descubrimiento del Ciclo de F. hepatica Ins. Nal. Inv. For. y Agrop. (INIFAP).
49. MURRAY, M. and B. RUSHTON, 1975. The pathology of fascioliasis with particular reference to hepatic fibrosis. Simposia of the british SOC.

for Parasitol. Vol. 13. Pathogenic processes in the parasite Infections. Ed. by A.E.K. Taylor and R. Muller. Blackwell Sci. Pub. Oxford, pp 27-41.

50. MUZQUIZ, M.J.L., ALONSO MARTINEZ, J.L., SANCHEZ ACCVEDO, C. y SANCHEZ FRANCO, A. 1981. Efecto de la Infección Experimental por F. hepatica en ovinos sobre la respuesta inmune humoral a antígenos Timo-dependien tes. Revista Ibérica de Parasitología. 41:111-117.
51. NAJERA, F.R.A. 1982. Fasciolosis. Zoonosis Parasitarias. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM pp 237-242.
52. NAQUIRA VILDOSO, F. and MARCIAL ROJAS R.A. 1971. Fasciolosis. In: Pathology of Protozoal and Helminth Diseases. The William and Wilkins Company, Baltimore.
53. PAPPAS, M.G., HAJKOWSKI, R., HOCKMEYER, W.T. 1983. Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): A microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol. Methods. 64:205-214.
54. PAPPAS, M.G., HAJKOWSKI, R., CANNON, L.T. and HACKMEYER, W.T. 1984. (Dot-ELISA): Comparision with standard ELISA and Complement Fixation Assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol., 14:239-249.
55. PANTELOURIS, E.M. 1965. The Common liver fluke Fasciola hepatica Pergamen Press. Oxford pp 3-21.
56. QUIROZ, R.H., 1984. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los animales domésticos. Limusa. México.
57. RAJASEKARIAH, G.R. and M.J. HOWELL, 1977. The fate of Fasciola hepatica metacercarie following infection of immunerats. J. Helminth., 51:289-294.
58. RUIZ-NAVARRETE, M.A. 1987. Análisis Inmunológico de los antígenos de Fasciola hepatica. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Fac. Est. Sup. Cuautitlán. UNAM.
59. SOULSBY, E.J.L. 1982. Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals. Edit. Baillieri Tindall, London Seventh Edition. pp 40-50.

60. SPENGLER, R.N. and H. ISSEROF, 1981. Fasciolosis: Is the anemia caused by hematophagia. J. Parasitol., 67:886-892.
61. TOLEDO ROA, E.L. 1985. Aislamiento, purificación y caracterización química del glucocálix de F. hepatica. Tesis profesional ENCB. Instituto Politécnico Nacional.
62. VAN TIGGELE, L.J., 1978. Host-parasite relation in F. hepatica infections. Immunopathology and diagnosis of liver fluke disease in ruminants. Thesis. Rijksuniversiteit, Leiden. the Netherlands.
63. WESCOTT, R.B., FARRELL, C.J., SHEH, D.T. 1984. Diagnosis of naturally occurring Fasciola hepatica infections in cattle with an Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Am. J. Vet. Res., 45:178-179.
64. YAMAGUTI, S. 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vol. 1. Satyu Yamaguti, Kioto, Japan pp. 718-719.
65. YOSHIHARA, S., N. TAIRA and K. SUSUKI, 1981. Antigenic comparison among several developmental stages of F. hepatica Jp. J. Vet. Sci. 43:699-707.
66. ZIMMERMAN, G. L., JEN, L.W., CERRO, B.S. et al., 1982. Diagnosis of Fasciola hepatica infections in sheep by and Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Am. J. Vet. R. 43:2097-2100.
67. ZIMMERMAN, G.L., M.J. NELSON, C.R.B. CLARCK. 1985. Diagnosis of ovine fasciolosis by a dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay: A rapid microdiagnostic technique. Am. J. Vet. Res., Vol. 46:1513-1515.