

00343

5
2ej°



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**COMPARACION DE LA EFICACIA E IMPACTO
INMUNOLOGICO DE DOS FASCIOLICIDAS
CONTRA Fasciola hepatica EN BORREGOS
PELIBUEY INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA ANIMAL)**

P R E S E N T A :
REMEDIOS YOLANDA VERA MONTENEGRO

Director de Tesis: Dr. Froylán Ibarra Velarde

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

A MIS PADRES

Jose Vera

Gullermina Montenegro

Por todo su amor , apoyo y comprensión.

**A mi hijo José Alonso quién con su ternura y amor me
impulsa a seguir adelante.**

A G R A D E C I M I E N T O S

**A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO**

Este estudio fue financiado parcialmente por la Comisión de la Comunidad Económica Europea, Programa STD-II, (Contrato No T 52-0200-F) a través de un Subcontrato establecido con el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INRA) de Francia.

INDICE

		Página
	RESUMEN	1
1.	INTRODUCCION	1
2.	ANTECEDENTES	10
3.	OBJETIVOS	12
4.	MATERIAL Y METODOS	12
4.1.	Animales	13
4.2.	Manejo	13
4.3.	Producción de metacercarias	13
4.4.	Fasciolicidas	13
4.5.	Diagnóstico	13
4.6.	Estudio inmunológico	14
4.6.1	Obtención del suero	14
4.6.2.	Obtención del antígeno	14
4.6.3.	Titulación del conjugado	15
4.6.4.	Titulación de sueros y antígenos	16
4.7.	Infecciones y Tratamientos	18
4.8.	Sacrificio de ovinos	23
4.9.	Análisis estadístico	24
5.	RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE: NITROXINIL	26
5.1.	Eficacia antihelmíntica	26
5.2.	Recuperación de fasciolas	28
5.3.	Tamaños y contrastes de las fasciolas recuperadas por grupo	30
5.4.	Evaluación inmunoenzimática	37

5.5.	Peso del hígado	44
5.6.	Análisis coprológicos	46
6.	DISCUSION DE LA PRIMERA FASE	46
6.1.	Recuperación de fasciolas	46
6.2.	Longitud de fasciolas	51
6.3.	Evaluación inmunoenzimática	53
6.4.	Peso del hígado	56
6.5.	Coproscopía	56
7.	CONCLUSIONES	58
8.	RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE: TRICLABENDAZOL	60
8.1.	Eficacia antihelmíntica	60
8.2.	Recuperación de fasciolas	62
8.3.	Tamaños y contrastes de las fasciolas	65
8.4.	Evaluación inmunoenzimática	73
8.5.	Peso del hígado	82
8.6.	Análisis coprológicos	84
9.	DISCUSION DE LA SEGUNDA FASE	87
9.1.	Recuperación de fasciolas	88
9.2.	Longitud de fasciolas	89
9.3.	Evaluación inmunoenzimática	91
9.4.	Peso del hígado	93
9.5.	Coproscopía	93
9.6.	Eficacia antihelmíntica	94
10.	CONCLUSIONES.	95
11.	LITERATURA CITADA	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recuperación de <i>F. hepatica</i> con Nitroxinil.	29
Figura 2. Fasciolas recuperadas por sexo del ovino.	32
Figura 3. Longitud de <i>F. hepatica</i> con Nitroxinil.	32
Figura 4. Frecuencia por tallas en los grupos testigos infectados y re infectados	34
Figura 5. Longitud de <i>F. hepatica</i> por sexo con Nitroxinil.	34
Figura 6. Frecuencia por tallas en los grupos infectados y tratados.	36
Figura 7. Frecuencia por tallas en los grupos tratados y re infectados.	36
Figura 8. Determinación de anticuerpos (IgG) anti- <i>F. hepatica</i> en los grupos testigos.	38
Figura 9. Fluctuación de anticuerpos (IgG) anti- <i>F. hepatica</i> en los grupos testigos.	38
Figura 10. Determinación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados y no re infectados.	41
Figura 11. Fluctuación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados y no re infectados	41
Figura 12. Determinación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados y re infectados.	43

Figura 13. Fluctuación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados y reinfectados.	43
Figura 14. Peso promedio del hígado por sexo del ovino	45
Figura 15. Recuperación de <i>F. hepatica</i> con Triclabendazol	63
Figura 16. Fasciolas recuperadas por sexo del ovino.	66
Figura 17. Longitud de fasciolas con Triclabendazol.	66
Figura 18. Frecuencia por tallas en los grupos testigos infectados y reinfectados.	68
Figura 19. Longitud de <i>F. hepatica</i> por sexo con triclabendazol	68
Figura 20. Frecuencia por tallas en los grupos tratados en la semana 5. (Juveniles).	70
Figura 21. Frecuencia por tallas en los grupos tratados en la semana 8. (Adultas).	70
Figura 22. Frecuencia por tallas en los grupos infectados y tratados.	72
Figura 23. Frecuencia por tallas en los grupos tratados y reinfectados.	72
Figura 24. Determinación de anticuerpos (IgG) anti- <i>F. hepatica</i> en los grupos testigos.	75

Figura 25. Fluctuación de anticuerpos (IgG) anti- <i>F.hepatica</i> en los grupos testigos.	75
Figura 26. Determinación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados en la semana 5 (Juveniles).	77
Figura 27. Fluctuación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados en la semana 5.	77
Figura 28. Determinación de anticuerpos (IgG) e grupos tratados en la semana 8 (Adultas).	79
Figura 29. Fluctuación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados en la semana 8.	79
Figura 30. Determinación de anticuerpos (IgG) en los grupos infectados y tratado.	81
Figura 31. Fluctuación de anticuerpos (IgG) en grupos infectados y tratados.	81
Figura 32. Determinación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados y reinfectados.	83
Figura 33. Fluctuación de anticuerpos (IgG) en grupos tratados y reinfectados.	83
Figura 34. Peso promedio del hígado por sexo del ovino	85

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Evaluación de la infección y reinfección de *Fasciola hepatica* en ovinos tratados con Nitroxinil. 27
- Cuadro 2.** Cantidad y talla de *Fasciola hepatica* recuperadas por sexo de ovinos tratados con Nitroxinil. 31
- Cuadro 3.** Porcentaje de animales por grupo, positivos a huevos de *Fasciola hepatica* mediante la técnica de sedimentación. 47
- Cuadro 4.** Evaluación de la infección y reinfección de *Fasciola hepatica*. en ovinos tratados con Triclabendazol. 61
- Cuadro 5.** Cantidad y talla de *Fasciola hepatica* recuperadas por sexo de ovinos tratados con Triclabendazol. 64
- Cuadro 6.** Porcentaje de animales por grupo, positivos a huevos de *Fasciola hepatica* mediante la técnica de sedimentación. 86

RESUMEN

COMPARACION DE LA EFICACIA E IMPACTO INMUNOLOGICO DE DOS FASCIOLICIDAS CONTRA *Fasciola hepatica* EN BORREGOS PELIBUEY INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

Los objetivos del presente estudio fueron: 1). Determinar la eficacia de Nitroxinil (NTX) y Triclabendazol (TCB), estimada a través de la presencia de *Fasciola hepatica* en el hígado y la disminución de huevos en las heces. 2). Determinar y correlacionar la presencia de anticuerpos IgG contra *Fasciola hepatica* utilizando la prueba de ELISA, antes y después del tratamiento de ovinos experimentalmente infectados. Para ello se midieron varios parámetros tales como presencia de huevos del parásito, valoración de la respuesta inmune utilizando la prueba de ELISA, conteo de *Fasciolas* a la disección del hígado, eficacia antihelmíntica del NTX y TCB estimada como porcentaje de reducción de parásitos, susceptibilidad del hospedero a la presencia de los tremátodos dependiendo del sexo, así como la longitud de los mismos. El estudio se dividió en dos fases: Fase 1 Nitroxinil y Fase 2 Triclabendazol. Se utilizaron 119 ovinos Pelibuey, divididos en 17 grupos de 7 animales cada uno. Los borregos fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias cuando constituían parte de los grupos infectados o reinfectados. Los tratamientos con NTX y TCB, fueron administrados de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por el fabricante. Todos los ovinos de los grupos experimentales, fueron sacrificados 16 semanas posteriores a la infección o tratamiento. Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de Tukey y a un diseño factorial. Los resultados indicaron una eficacia para NTX de 99.7, 72.1, 66.5 y 94.8 % en los grupos 5, 6, 7 y 8 respectivamente y para TCB de 34.4, 49.4, 68.0, 73.0, 66.9 y 86.6 % en los grupos 11, 12, 13, 14, 15 y 16 respectivamente. Tanto para NTX como para TCB, los valores de ELISA demostraron anticuerpos específicos de *F. hepatica* desde la 2da. semana postinfección pero no indujeron ninguna respuesta protectora significativa. Los tratamientos contra *Fasciola* a las 5 y 8 semanas, seguidos de reinfección 2 o 5 semanas postinfección, tampoco produjeron protección significativa, comparados con los grupos testigo. La longitud de *Fasciolas* mostró que los parásitos no expuestos al tratamiento antihelmíntico, alcanzaron mayor talla. En el caso de NTX parece ser que el sexo de los hospederos influyó en la sensibilidad a la presencia de *Fasciola*, ya que en todos los grupos testigos las mayores tallas del tremátodo correspondieron a hospederos machos. Los análisis coprológicos demostraron la presencia de huevos del parásito entre la 8va. y 10a. semana postinfección. Se concluye que no hubo relación entre el número de *Fasciolas* presentes y la respuesta inmune. Hubo una gran heterogeneidad de la infectividad de las metacercarias en ambas fases. NTX fué proporcionalmente más eficiente que TCB contra *Fasciolas* de 5 y 8 semanas de edad. Las *Fasciolas* remanentes después del tratamiento fueron mayores en longitud. La infección seguida por reinfección, no indujo protección comparada con los grupos testigo.

1. INTRODUCCION

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de bovinos, ovinos y caprinos, debida a la acción del tremátodo del hígado *Fasciola hepatica*, aunque también puede presentarse en caballos, perros, conejos, cuyes, ardillas, venados, castores, cerdos y, en ocasiones, el hombre (Quiroz, 1984).

Su distribución geográfica corresponde a la de los hospederos intermediarios, que son caracoles dulceacuícolas pulmonados, principalmente del género *Fossaria* (Vera, 1985; Milián, 1986).

En México se han realizado algunos estudios que demuestran que la frecuencia de la fasciolosis es muy alta. Encinas et al (1989), en una recopilación de datos de los registros del Rastro de Ferrería de la Cd. de México en el período comprendido de 1977 - 1987, encontraron que de un total de 2,101,224 bovinos sacrificados se decomisaron 109,127 hígados de *Fasciola hepatica*, lo cual corresponde a un 5.19% del total de sacrificios. Considerando 7 Kg como el peso promedio de cada hígado, las pérdidas por este concepto ascienden a 763,889 kg de hígado de bovino decomisado, lo que al hacer una conversión a el precio actual del hígado, resulta en pérdidas por miles de nuevos pesos. Esto también ha sido observado en rastros pequeños del Edo. de México donde la frecuencia de la enfermedad alcanzó 29.3 % en bovinos y 19.0 % en ovinos (Arroyo, 1991).

La importancia económica de ésta enfermedad radica en las graves pérdidas económicas que produce a la industria pecuaria, principalmente en ganado ovino y bovino en todo el mundo. Este efecto se manifiesta como una disminución en la producción de carne, leche, lana, baja de la fertilidad, así como en un aumento del número de hígados decomisados y en algunos casos puede ocasionar hasta la muerte del animal (Hernández, 1976; Milián, 1986).

Con base en la importancia desde el punto vista económico señalado y, sobre todo, en que existe disminución de productos de origen animal disponibles para la alimentación humana, se manifiesta la necesidad de establecer métodos efectivos de control para esta parasitosis (Horner, 1970). Esto puede lograrse mediante el control de los caracoles hospederos intermediarios y la utilización de productos antihelmínticos para el tratamiento de los animales. El primer método es difícil, caro y poco práctico; mientras que el segundo método es más práctico y eficaz (Craig y Huey, 1984).

En años recientes, el uso de fasciolicidas se ha incrementado y nuevas compuestos anti-Fasciola han sido lanzados al mercado de México. Sin embargo la fasciolosis persiste y hasta ahora no ha sido adecuadamente controlada. Una de las razones de esto es que los recursos económicos destinados a combatir ésta enfermedad no han sido suficientes para establecer buenas medidas de control, las cuáles están basadas en un conocimiento adecuado epidemiológico, quimioterapéutico e inmunológico.

Por lo tanto, en la actualidad el control de ésta enfermedad se requiere realizar en el hospedero definitivo. Utilizando la mejor alternativa con la que se cuenta en el momento, el tratamiento antihelmíntico. En cuanto a las posibilidades de que se logrará la erradicación de ésta enfermedad, son remotas mientras existan reservorios silvestres tales como conejos, ratas, venados, jabalíes, etc.

Hasta ahora, la quimioterapia es el único método con el que se cuenta para el control de la fasciolosis. Para ello, existen varias moléculas disponibles en México, tales como: Disofenol, Hexacloroetano, Meniclofolan, Oxiclozanida, Hexaclorofeno, Albendazol, etc, siendo la mayoría de ellas eficientes contra el estado adulto del parásito (Gibson, 1975). Otros compuestos como el Nitroxinil (Davis et al, 1966), el Clorsulon (Malone et al, 1984) y Rafoxanide (Morzik et al, 1969), han sido descritos como eficaces contra *F. hepatica* de 6 semanas de edad en adelante. También existen compuestos como el Dianfenetide y el Triclabendazol que han mostrado ser eficaces contra fasciolas inmaduras (Harfenist, 1973; Boray et al 1983; Ibarra et al. 1989a).

Sin embargo, por lo anteriormente descrito el compuesto anti-fasciola ideal todavía no existe. Un fasciolicida ideal sería aquel que además de tener un amplio margen de seguridad, ser de fácil aplicación y bajo costo; eliminara a todos los estados evolutivos del tremátodo dentro del hospedero (Ibarra, et al ,1989a).

Dentro de los productos arriba mencionados como Fasciolicidas existentes en el mercado de México, los productos Nitroxinil y Triclabendazol revisten vital importancia en virtud de su alta efectividad, siendo una de las razones por las cuales han sido motivo de este estudio.

El Nitroxinil, (Trodx^R, Rhone-Merieux), es un compuesto cuya fórmula estructural es yodo-3-hidroxi-4-nitro-5-benzonitrilo. Son cristales amarillos de benceno poco solubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Tiene dos sales, nitroxinil meglubina y nitroxinil eglumina. Es casi inodoro y se caracteriza por ser una solución estable. Actúa inhibiendo la fosforilación oxidativa del parásito. Se fija a los tejidos y se elimina lentamente del organismo vía orina y heces, permaneciendo en los tejidos hasta 30 días (Sumano y Ocampo 1989).

Es uno de los fasciolicidas con más tiempo en el mercado y uno de los más utilizados por los ganaderos de México. Se administra por vía subcutánea, en dosis de 10 mg/kg. A la dosis de 15 mg/kg, muestra una eficacia de hasta el 100 % frente a fasciolas adultas en bovinos y en ovejas hasta del 90 % contra fasciolas de más de cuatro semanas de edad (Soulsby, 1987). Además, posee una efectividad de un 95 al 100% contra fasciolas de 9 a 12 semanas de edad (Burrows, 1978).

La eficiencia de Nitroxinil ha sido demostrada ampliamente utilizando la dosis de 10 mg/kg (Dobbins y Wellington, 1982; Raptic

t al, 1988; Ibarra y Vera, 1991). Estos tratamientos fueron aplicados a animales jóvenes los cuales son más susceptibles a la enfermedad.

El Triclabendazol, (Fasinex^R, Ciba-Geigy), cuyo nombre químico es el 6-cloro-5-(2,3-diclorophenoxy)-2-methylthiobencimidazol, es un compuesto virtualmente insoluble en agua y tiene la gran ventaja de que la máxima dosis tolerada (índice de seguridad) es de hasta 20 veces la dosis recomendada. Su farmacocinética sugiere que el derivado sulfóxido es el principio activo de su actividad fasciolicida *in vivo*. Este metabolito ejerce un efecto lento el cual, a dosis menores a las recomendadas por el fabricante, retarda la maduración del parásito, se cree que actúa produciendo la inhibición de la fumarato reductasa e interfiriendo con las funciones de los microtubulos (Eckert et al, 1984). Este producto es un derivado de los bencimidazoles, y tiene una alta eficacia contra estadios inmaduros tempranos, inmaduros y adultos del tremátodo (Boray et al, 1981). En ovejas artificialmente infectadas a la dosis de 5 mg/kg el producto fue efectivo en un 92-98% contra fasciolas de 4 - 8 semanas y un 100% efectivo contra parásitos adultos. A la dosis recomendada de 10 mg/kg fue de 93-98% efectivo contra fasciolas de una semana de edad y de un 99-100% efectivo contra fasciolas de 6 semanas o mayores (Boray et al, 1983).

En México, el Triclabendazol está siendo utilizado para el tratamiento de fasciolosis en áreas endémicas, demostrando eficacias de más del 90% en rumiantes infectados experimentalmente

y con infección natural (Ibarra et al, 1987; Sánchez et al, 1988; Quiroz et al, 1988; Ibarra et al, 1989b; Ibarra y Vera, 1991).

Información similar ha sido obtenida por diversos autores (Wolff et al, 1982; Boray et al, 1983; Dorchis et al, 1983; Craig y Huey, 1984; Turner et al, 1984; Rapic et al, 1988).

Por otro lado, la mayoría de investigaciones sobre fasciolidas, han sido llevadas a cabo en relación con su eficacia (Wellington, 1978; Foreyt et al, 1980; Maes et al, 1998 y Maes et al, 1990), evaluadas por conteo de fasciolas adultas o por diagnóstico coproparasitológico dentro de las siete días posteriores al tratamiento. Sin embargo, la literatura señala pocos datos concernientes a la administración de un tratamiento y el efecto de este sobre la inmunidad adquirida. De ahí que se generan preguntas tales como: ¿Cuándo ocurrieron las reinfecciones?, ¿fueron éstas inmediatamente, ó dentro de algunas semanas?.

El estudio de la respuesta inmune del hospedero contra especies del género *Fasciola*, a través de la experimentación, puede conducir a entender mejor la forma en que el sistema inmune de los animales actúa contra el parásito; de tal manera que con ese conocimiento se pueda orientar estudios para el desarrollo de métodos de diagnóstico confiables y sistemas inmunológicos de prevención (Haroun et al, 1980; Haroun y Hyllier, 1986).

Con relación al perfil de anticuerpos de animales infectados con *Fasciola hepatica* en forma natural o experimental, y tratados posteriormente con fasciolicidas, se cuenta con algunos estudios realizados en ratas, conejos, ovinos y bovinos (Haroun, 1980; Haroun y Hyllier, 1986). Smithers y Terry (1969), realizaron un estudio sobre inmunidad de tremátodos tales como *Fasciola* y *Schistosoma* mostrando la condición en la cual un animal es parcialmente resistente a un desafío por infección como resultado de infección primaria. Este fenómeno, ha sido observado en algunas especies de animales domésticos y de laboratorio (Smithers y Doenhoff, 1982), y se ha estudiado en detalle en la rata, la cual como el hombre no es un huésped ampliamente susceptible a *F. hepatica* (Doy et al 1980; Hughes et al, 1981). Los mecanismos efectores que operan en la inducción de esta inmunidad han sido materia de estudio especialmente para IgG e IgE (Sher et al, 1977). Al respecto varios autores (Jarrett y Bazin, 1974; Jarrett y Miller, 1982), señalan que el papel de la IgE no específica en los mecanismos inmunes contra infecciones por *Fasciola hepatica* no están todavía bien establecidos.

Serodiagnóstico de la fasciolosis. - Para la detección de la fasciolosis en los años 50^s se utilizaba la prueba de inmunodifusión. Sin embargo los resultados obtenidos con relación a su aplicación en el campo, no fueron del todo convincentes (Urquhart, 1955; Spulek et al, 1958). Uno de los resultados más promisorios considerados como de amplia aplicación, fue alcanzado por el método de hemaglutinación indirecta, con el cual se

utilizaron antígenos obtenidos de parásitos adultos (Van Tiggele, 1978). Por otro lado se ha usado una prueba de fluorescencia indirecta para detectar anticuerpos, utilizando antígenos de fasciola inmadura temprana de 25 días de edad (Horchner et al, 1976). Esta técnica permitió la detección de infecciones de *Fasciola* a las 3 semanas postinfección, considerando la especificidad como satisfactoria pero los resultados fueron variables. A pesar de la alta sensibilidad y la detección más temprana postinfección, la técnica nunca se utilizó como prueba de rutina para detectar infecciones por *F. hepatica*, particularmente por el consumo de tiempo, alto costo y dificultad para leerla (Jarramendy et al, 1985). Posteriormente, se introdujo la prueba del Ensayo inmunoenzimático comúnmente conocida como ELISA, la cual ha sido utilizada en el diagnóstico de varias enfermedades parasitarias (Voller et al, 1976), obteniendo una alta sensibilidad. Dicha prueba no solo permite realizar una detección temprana de anticuerpos contra *Fasciola hepatica* sino que además puede detectar diferencias cuantitativas en relación a intensidades de infección (Wyckoff y Bradley, 1986). En el año de 1982, Zimmerman et al, utilizaron el método de ELISA el cual permitió detectar fasciolosis ovina experimental desde las 6 semanas postinfección. Santiago y Hillyer (1988) detectaron anticuerpos contra *F. hepatica* mediante ELISA a las 4 semanas postinfección. Esta prueba resultó ser superior y más práctica, ya que fue demostrada con éxito en un estudio seroepidemiológico en una población de borregos en Etiopía (Njau et al, 1989).

En la actualidad ésta prueba ha sido utilizada para la detección de anticuerpos de un considerable número de enfermedades tales como: fasciolosis (Jemli et al, 1987; Sinclair y Wassall, 1988; Bunch et al, 1990), Malaria (Fortier et al, 1987; Londoner et al, 1987; Katzin et al, 1988), Toxoplasmosis (Lindenschmidt, 1985; Van Knapen et al, 1986), Hidatidosis (Craig, 1986), Cisticercosis cerebral (Estrada et al, 1989), Filariasis (Huijun et al, 1987; Weil et al, 1987), Schistosomiasis (Deelder, 1989). En términos generales, la relación hospedero-parásito es un vínculo de naturaleza dinámica que cambia frecuentemente, lo cual significa que el parásito constantemente desarrolla mecanismos de adaptación para relacionarse mejor con su hospedero. Esta relación se puede contemplar como un sistema de retroalimentación negativa, en donde cada una de las partes de la interrelación hospedero-parásito está influenciada por las actividades complementarias de la otra parte. El parásito interfiere con la fisiología del hospedador, produciendo una serie de alteraciones que en conjunto conforman la enfermedad. Por otra parte, el parásito tiene que ser capaz de resistir las reacciones defensivas del hospedero para sobrevivir, por lo cual ha desarrollado notables mecanismos de la resistencia (Bautista, 1986a).

Fasciola hepatica es capaz de infectar una amplia gama de mamíferos, sin embargo cada especie presenta distinto grado de resistencia a la infección, en donde Ross (1967) y Boray (1969) (citados por Bautista, 1986a) presentan una clasificación de resistencia natural a la infección en tres grupos:

El grupo de menor resistencia lo conforman el borrego, caballo, burro, ratón y los cuyos. El grupo de resistencia moderada lo conforman el hombre, los bovinos y la rata, y el grupo de mayor resistencia lo conforma el cerdo.

2. ANTECEDENTES

Desde 1931 se sospechaba que el ganado bovino desarrolla resistencia contra *Fasciola hepatica* y que era capaz de rechazar su carga parasitaria, después de un cierto periodo de tiempo. No fue sino hasta 1972 en que Doyle, demostró que el rechazo ocurre alrededor de 24 semanas después de la infección primaria. Otros autores como Ross (1966 y 1967); Boray (1969); Doyle (1971 y 1972), demostraron la habilidad del ganado para resistir la reinfección.

Sin embargo, la naturaleza de esta resistencia no es clara y ha sido objeto de controversia a través de los años, preguntandose si esto es verdaderamente un fenómeno inmunológico o si es debido a barreras físicas impuestas por el hígado previamente infectado que se encuentra dañado y altamente fibrótico.

En la rata, la resistencia a la reinfección ocurre dentro de las 48 horas de desaffo (Doy et al, 1980) y se ha demostrado, que al menos dos mecanismos de resistencia operan en el hospedero: El primero se

realiza en el intestino y el segundo se realiza en la cavidad del cuerpo (Doy et al, 1980; Burden et al, 1983).

Los mecanismos de resistencia están correlacionados con la destrucción ocasionada por el tremátodo. Lo interesante de los mecanismos, es que el parásito muere antes de que sea capaz de penetrar en el hígado (Doy y Hughes, 1984). Esperando que si operan mecanismos similares en el ganado bovino, entonces se podría esperar que el número de fasciolas recuperadas en la cavidad del cuerpo de animales resistentes, fuera menor que los controles sin previa infección.

En el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INRA) de Francia, se han realizado algunos ensayos experimentales utilizando al conejo como modelo experimental, en donde se ha demostrado que este animal muestra sensibilidad a la reinfección después de un tratamiento antihelmíntico (Boulard, com. per, 1989).

Haroun y Hillyer (1986) mencionan que no hay evidencia que indique que una sensibilización primaria de borregos con *Fasciola hepatica* estimule alguna resistencia al desafío en términos de reducción en el número de parásitos recuperados de la infección. Esta aseveración también es corroborada por Sinclair, 1971; Knight, 1980; Doy y Hughes, 1984; Soulsby, 1987; Bautista, 1986. Pero no existen reportes en cuanto a interacciones de respuesta inmunológica debidas a infección y/o tratamiento y/o reinfección, por lo que en el presente estudio se analizó el efecto de la

quimioterapia utilizando Nitroxinil y Triclabendazol, sobre la premunición adquirida durante una infección seguida por una reinfección experimental en ovinos infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

3. OBJETIVOS

1. Determinar la eficacia de Nitroxinil y Triclabendazol, estimada a través de la presencia de *Fasciola hepatica* en el hígado y la disminución de huevos en las heces.
2. Determinar y correlacionar la presencia de anticuerpos IgG contra *Fasciola hepatica* utilizando la prueba de ELISA, antes y después del tratamiento de ovinos experimentalmente infectados.

4. MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se desarrolló en el Centro Experimental "Las Margaritas" ubicado en Hueytamalco, Puebla, y en el Centro Nacional de Investigaciones Dicipinario en Parasitología Veterinaria (CENID), ubicado en Jiutepec, en el Edo. de Morelos.

4.1. Animales. Se utilizaron 119 ovinos de raza pelibuey y sus cruza con Suffolk y Dorset, la edad de los animales fluctuó alrededor de los ocho meses. Los animales fueron distribuidos en grupos experimentales, en donde se procuró conservar la misma proporción de sexos y pesos.

4.2. Manejo. Los ovinos fueron alojados en una área libre de *Fasciola*, en donde fueron alimentados con pastura y alimento concentrado.

4.3. Producción de metacercarias. Se produjeron 21,600 metacercarias de *Fasciola hepatica* a partir de la infección de caracoles *Fossaria bulimoides*, mismos que a su vez se infectaron con miracidios de origen bovino. La metodología utilizada fue de acuerdo a lo señalado en el Manual de Técnicas de Laboratorio de Parasitología Veterinaria (Anónimo, 1986). Todos los procesos fueron realizados en el laboratorio del CENID.

4.4. Fasciolicidas. Se utilizó el Nitroxinil (Trodx^R, Rhone-Merieux) a la dosis de 10 mg/kg/vía subcutanea y el Triclabendazol (Fasinex^R, Ciba-Geigy) a la dosis de 10 mg/kg/vía oral (Dosis recomendadas por el fabricante).

4.5. Diagnóstico. Se realizó el diagnóstico coprológico en cada uno de los ovinos, utilizando la técnica de sedimentación descrita por el Manual de Técnicas de Laboratorio de Parasitología Veterinaria (Anónimo, 1986).

4.6. Estudio inmunológico.

Para evaluar la respuesta inmunológica de cada animal, se realizó la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA), como lo describe Boulard et al (1985), realizándose:

4.6.1. Obtención del suero. Todos los ovinos en estudio fueron sangrados de la vena yugular, utilizando tubos vacutainer (Becton Dickinson). La sangre obtenida fue centrifugada a 2000 x g durante 8 min. El suero obtenido se almacenó en viales manteniéndose en congelación a -20°C hasta su utilización.

4.6.2. Obtención del antígeno. A partir de las excreciones y secreciones de las fasciolas adultas, se obtuvo de la siguiente manera:

Se colectaron fasciolas adultas de los conductos biliares de hígados de bovinos infectados en forma natural y sacrificados en el rastro. Los parásitos colectados se lavaron dos veces en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) estéril, posteriormente se colocaron en botellas de cultivo de 50 ml las que contenían una solución de Hedon-Fleig estéril (Bautista y Morilla, 1986) con antibióticos (Penicilina 100 UI + Estreptomina 100 µg/ml) durante 12 horas en incubación a 37°C. Las fasciolas fueron retiradas y el líquido se centrifugó a 5000 x g durante 20 minutos a 4°C (Bautista, 1986). Se

obtuvo el sobrenadante y se le agregó una mezcla de inhibidores de proteasas: PMSF 100 mM, EDTA 50 mM, TLCK 20 mM (Keesey, 1987), el cual fue envasado y guardado a -20°C hasta el momento de su uso (Bautista, 1986). La concentración de proteínas del antígeno, se determinó por espectrofotometría en luz ultravioleta (UV). (Garvey, 1977).

4.6.3. Titulación del conjugado. Se utilizó un conjugado comercial anti-IgG ovino preparado en burro unido a peroxidasa de rábano (Sigma-immunochemicals). Para su titulación se empleó la técnica de ELISA directa, de la siguiente manera:

1. Se sensibilizaron microplacas de poliestireno Maxisorb (Intermed) de 96 pozos, con 100 μl de suero normal de ovino diluido 1:500 en solución de carbonatos-bicarbonatos (pH 9.6), se incubó a 37°C durante una hora; las placas fueron lavadas en 5 ocasiones consecutivas con SSAF pH 7.2 con 0.1% de Tween 20 (solución de lavado).

2. A cada pozo se le agregó 150 μl de solución bloqueadora (solución de carbonatos-bicarbonatos (pH 9.6) con 0.5% gelatina) incubándose 30 minutos a 37°C , posteriormente se realizaron los 5 lavados.

3. Se hicieron diluciones dobles seriadas del conjugado en SSAF pH 7.2 iniciando con una dilución de 1:50 hasta 1:12800, se

agregaron 100 μ l de las diluciones por pozo. La placa se incubó 30 min. a 37°C. Pasado este tiempo se realizaron los lavados.

4. Se adicionaron 100 μ l por pozo de la solución del sustrato ABTS 2,2'-Azino - bis (3-etilbenzothiazolin-6-ácido sulfónico) (SIGMA) en ácido cítrico 0.1 M, pH 4 (5 μ l de solución stock de ABTS + 1 μ l peróxido de hidrógeno 30%/ml de ácido cítrico). Cada placa se dejó 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 μ l de ac. cítrico 0.5 M.

5. La absorbancia fue medida a 415 nm, utilizando el lector ELIA Mod. 0049 (Instrumentos Fisher). La dilución del conjugado se seleccionó de acuerdo a la absorbancia, y se optó por una dilución 1:5000, siendo esta dilución la que dio la mayor diferencia entre lecturas de sueros testigos positivos y negativos.

4.6.4. Titulación de sueros y antígeno. Para la titulación de sueros se empleó una mezcla de sueros de borregos, infectados en forma natural con *F. hepatica* como testigo positivo, para el testigo negativo se utilizó un suero de borrego sin anticuerpos anti - *F. hepatica* probado previamente por inmunoensayo en capa delgada. La titulación de los sueros y el antígeno se realizó de la siguiente manera:

1. Se sensibilizó la placa con diluciones dobles de antígeno en sol de carbonatos-bicarbonatos (pH 9.6). Se inició la primer dilución con 160 μ g/100 μ l, se colocaron 100 μ l de las

diluciones por pozo, se incubó 30 min, a 37°C y pasado este tiempo se hicieron cinco lavados.

2. Se bloquearon las placas con 150 µl de la solución mencionada, incubándose 30 min. a 37°C, lavándose cinco veces las placas.

3. Se agregaron 100 µl de sueros testigos a dos diluciones, 1:100 y 1:200, colocandolos de tal manera que para cada dilución de antígeno se colocó una dilución de sueros con una réplica. Se incubó 30 min. a 37°C y para retirar el suero se realizaron cinco lavados.

4. Se añadieron 100 µl de conjugado, anti-IgG ovino diluido 1:5000 en SSAP. El conjugado se diluyó poco antes de utilizarse. Las placas se incubaron 30 min a 37°C, posteriormente haciendose los cinco lavados.

5. Se colocaron 100 µl de solución de sustrato y se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 20 min. La reacción se paró añadiendo 100 µl de ácido cítrico 0.5 M y se procedió a la lectura a 415 nm.

La dilución de sueros seleccionada fue de 1:200 y la concentración de antígeno fue de 5 µg/pozo.

Los sueros obtenidos del trabajo experimental se probaron por duplicado con todos sus muestreos, colocandose por triplicado los sueros control positivos y negativos y una columna de blancos en toda la placa.

Los sueros se consideraron positivos cuando la lectura se encontró arriba de la media de los valores de los sueros negativos más una desviación estandar.

Para describir la respuesta inmunológica de los animales de cada tratamiento, se grafican: El promedio estimado de anticuerpos (IgG) por semana de evaluación de cada tratamiento y la fluctuación de anticuerpos en porciento, de acuerdo a la relación:

$$100 * (1 - A_0 / A_t)$$

Donde A_0 son los niveles de anticuerpos al inicio del experimento y A_t son los niveles de anticuerpos expresados como lectura de absorbancia en cualquier semana t.

4.7 Infecciones y Tratamientos. El estudio se dividió en dos fases, ante la imposibilidad de producir la suficiente cantidad de metacercarias al mismo tiempo. Los borregos fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias cuando constituían parte de los grupos infectados o reinfectados.

Para ambos productos se realizaron los análisis a partir de las semanas: 0, 5, 8, 10, 13, 16, 26 y 29; en el caso del Triclabendazol se agregaron dos semanas más: la 7 y la 23.

**FASE 1:
EVALUACION DE NITROXINIL**

Los ovinos fueron divididos al azar en ocho grupos de siete animales cada uno, asegurando que cada grupo experimental tuviera al menos 3 hembras y 3 machos, ante la sospecha de que el sexo del animal influyera sobre la respuesta del tratamiento. Se describe de manera esquemática la conformación de los grupos experimentales:

SEMANAS:	0	5	8	10	13	16	26	29		
Heces y sangre	+	+	+	+	+	+	+	+		
G R U P O S	1							S		
	2	I							S	
	3	I	R						S	
	4						I	S		
	5	I	N					S		
	6	I	N	R					S	
	7	I	N	R					S	
	8	I	N					S		

I = Infección N = Nitroxinil R = Reinfeción S = Sacrificio

GRUPO 1. No recibió infección con metacercarias, ni tratamiento antihelmíntico (testigo negativo), sacrificio en la semana 16.

GRUPO 2. Infección con metacercarias en la semana 0, y sacrificio del grupo en la semana 16.

GRUPO 3. Infección con metacercarias en la semana 0, reinfección con metacercarias en la semana 10 y sacrificio del grupo en la semana 26.

GRUPO 4. Infección con metacercarias en la semana 13 y sacrificio del grupo en la semana 29 (testigo positivo).

GRUPO 5. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Nitroxinil en la semana 5 y sacrificio en la semana 16.

GRUPO 6. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Nitroxinil en la semana 8, reinfección con metacercarias en la semana 10 y sacrificio del grupo en la semana 26.

GRUPO 7. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Nitroxinil en la semana 8, reinfección con metacercarias en la semana 13 y sacrificio del grupo en la semana 29.

GRUPO 8. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Nitroxinil en la semana 8, y sacrificio del grupo en la semana 16.

FASE 2:
EVALUACION DE TRICLABENDAZOL

Los ovinos fueron divididos al azar en nueve grupos de siete animales cada uno, que a diferencia de la primera fase, no fue posible conseguir el suficiente número de hembras para completar los grupos experimentales, de tal manera que únicamente se pudieron completar 2 hembras por grupo. La conformación de los grupos experimentales fue:

SEMANAS:	0	5	7	8	10	13	16	23	26	29	
Heces y sangre	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9							S				
10	I							S			
G	I	T R								S	
R	I	T		R							S
U	I	T								S	
P	I	T								S	
O	I	T		R							S
S	I	T		R							S
16	I	T								S	
17	I	R						S			

I = Infección T = Triclabendazol R = Reinfeción S = Sacrificio

GRUPO 9. No recibió infección con metacercarias, ni tratamiento antihelmíntico (testigo negativo), sacrificio en la semana 16.

GRUPO 10. Infección con metacercarias en la semana 0, y sacrificio del grupo en la semana 16.

GRUPO 11. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Triclabendazol en la semana 5, reinfección con metacercarias en la semana 7 y sacrificio del grupo en la semana 23.

GRUPO 12. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Triclabendazol en la semana 5, reinfección con metacercarias en la semana 10 y sacrificio del grupo en la semana 26.

GRUPO 13. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Triclabendazol en la semana 5 y sacrificio del grupo en la semana 16.

GRUPO 14. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Triclabendazol en la semana 8, reinfección con metacercarias en la semana 10 y sacrificio del grupo en la semana 26.

GRUPO 15. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Triclabendazol en la semana 8, reinfección con metacercarias en la semana 13 y sacrificio del grupo en la semana 29.

GRUPO 16. Infección con metacercarias en la semana 0, tratamiento con Triclabendazol en la semana 8 y sacrificio del grupo en la semana 16.

GRUPO 17. Infección con metacercarias en la semana 13 y sacrificio del grupo en la semana 29 (testigo positivo).

4.8 Sacrificio de ovinos. Los animales fueron sacrificado en la semana 16, después de la infección o reinfección con metacercarias, con la finalidad de que las fasciolas alcanzaran el estado adulto. Al momento del sacrificio de cada ovino, el hígado fue separado, se registró el peso y se revisó cuidadosamente para recuperar las fasciolas establecidas, las cuales se obtuvieron abriendo longitudinalmente los conductos biliares, posteriormente se disectaron en pequeños trozos, de aproximadamente un centímetro, para ser colocados en recipientes con solución salina a 37°C durante 30 minutos.

Posteriormente los trozos fueron removidos y los parásitos liberados fueron colectados y contados junto con los ya anteriormente encontrados.

Para estimar la intensidad de la parasitosis, se registraron las fasciolas completas y las incompletas, por la evidencia de algunas partes identificadas como la cabeza o la presencia de la ventosa oral.

Todas las fasciolas colectadas fueron medidas en su longitud, para observar si había diferencias de tamaño entre las fasciolas de los diferentes grupos de animales.

La eficacia de los fasciolicidas fue estimada en porcentaje (%) de reducción de fasciolas de los grupos tratados con respecto a los grupos controles.

4.9. Análisis Estadístico.

Las variables de respuesta a la eficacia de los fasciolicidas fue estimada en número y talla de *F. hepatica*, en donde las variables de explicación son el grupo experimental y el sexo.

El modelo con que se analizó la información generada correspondió a un diseño factorial con dos factores, de acuerdo con Montgomery (1984), siendo el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + (GS)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = ijk -ésima observación de la var. de respuesta.

μ = Media general.

G_i = Efecto del grupo experimental.

S_j = Efecto del sexo.

$(GS)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre grupo y sexo.

E_{ijk} = Error aleatorio.

En el caso de que el modelo aportara evidencias para mostrar discrepancia entre los factores en estudio, se procedió a determinar entre que niveles (celdas) existía diferencia significativa por medio de la prueba de Tukey (Montgomery 1984).

Para la primera fase (evaluación del nitroxinil) el diseño experimental se cumplió cabalmente, en el sentido de que el número de machos y hembras fue similar en todos los grupos experimentales, por lo que los dos factores en estudio fueron de efectos fijos.

Por el contrario, en la segunda fase (evaluación del triclabendazol) se presentó el inconveniente de la disponibilidad de hembras, por lo que el modelo factorial fue mixto, es decir el efecto del grupo se conservó fijo, pero el efecto del sexo fue variable, de acuerdo con Montgomery (1984) y Zar (1974).

Para describir la variabilidad en talla y número de *F. hepatica* se estimó el promedio (μ) y la desviación estándar (s); además de los intervalos de confianza con una precisión al 95% (Zar, 1974), en donde:

$$\text{Intervalo superior: } \mu + T_{0.05/2} s / (n)^{0.5}$$

$$\text{Intervalo inferior: } \mu - T_{0.05/2} s / (n)^{0.5}$$

El análisis de la información se realizó con ayuda del paquete estadístico SYSTAT (versión 5.0).

5. RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE:

NITROXINIL

El número promedio de tremátodos colectados de los 49 borregos infectados, así como el porcentaje de reducción de fasciolas y la longitud de las mismas, se encuentran descritas en el Cuadro 1, en donde se aprecia lo siguiente:

Se recuperaron 347 fasciolas de el grupo 2 (testigo infectado) y 424 del grupo 3 (testigo re infectado). Los grupos 4, 5, 6, 7 y 8 tuvieron un total de 103, 1, 118, 142 y 18 fasciolas respectivamente. El promedio de fasciolas encontradas por animal, fluctuó entre 0.1 hasta 60.5, siendo este último el promedio del lote de animales del grupo 3. El rango de parásitos encontrado por animal, osciló entre 0 y 84. Los resultados muestran una gran variabilidad, resultado de las condiciones naturales en que se desarrolló el experimento. Con relación a la longitud promedio de los tremátodos, se estimaron tallas entre 18.0 y 27.6 mm.

5.1. Eficacia antihelmíntica

La eficacia ejercida por Nitroxinil en términos de reducción de fasciolas para los grupos 5, 6, 7 y 8 fue de 99.7, 72.1, 66.5 y 94.8%, respectivamente. Su eficacia fue demostrada contra fasciolas juveniles de 5 semanas y adultas de 8 semanas de edad, en grupos

Cuadro 1. EVALUACION DE LA INFECCION Y REINFECCION DE *Fasciola hepatica* EN OVINOS TRATADOS CON NITROXINIL.

GRUPOS 7 ovinos/gpo 150 metacercarias/animal	FASCIOLAS RECUPERADAS				REDUCCION (%)	TAMAÑO long. x (mm)
	Total	Rango	Media	D.E*		
GRUPO 1 control no infectado	----	----	----	----	----	----
GRUPO 2 control infectado	347	27 - 71	49.5	± 12.6	----	22.95
GRUPO 3 Reinfectado semana 10	424	37 - 84	60.5	± 13.6	----	27.65
GRUPO 4 Infectado semana 13	103	0 - 26	17.1	± 15.8	----	19.85
GRUPO 5 Tratado semana 5	01	0 - 1	0.1	± 0.3	99.71	18.00
GRUPO 6 Tratado semana 8 y reinfectado semana 10	118	0 - 33	16.8	± 9.2	72.17	20.89
GRUPO 7 Tratado semana 8 y reinfectado semana 13	142	13 - 51	20.2	± 12.6	66.51	22.07
GRUPO 8 Tratado semana 8	18	0 - 16	2.5	± 5.4	94.81	19.31

* Desviación estandar

que no fueron reinfectedos. No se observó eficacia residual del tratamiento o desarrollo de ninguna protección adquirida a las 3 o 5 semanas posteriores al tratamiento en los grupos 6 y 7 (reinfectedos). Estos dos grupos no presentaron diferencias marcadas de infección con relación a los dos grupos testigos infectados con el mismo lote de metacercarias. (Cuadro 1).

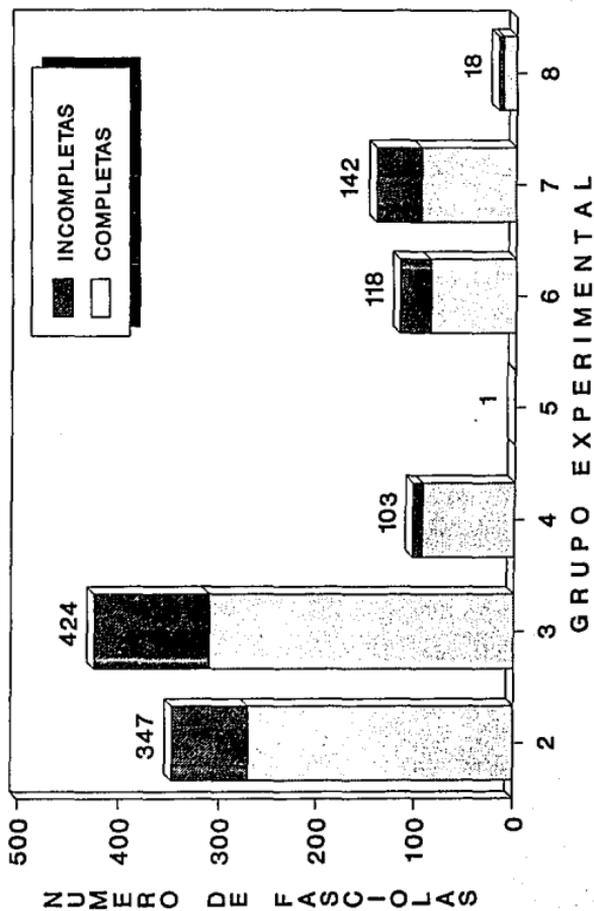
5.2. Recuperación de fasciolas

La Figura 1 muestra la recuperación de fasciolas de los grupos tratados con Nitroxinil, con relación a los grupos testigos, así como la proporción de fasciolas recuperadas completas e incompletas. En donde se ratifica que el grupo 3 es el lote de animales donde se presenta la mayor frecuencia, ya que se expuso en dos ocasiones a la presencia del parásito.

Con respecto a los grupos testigos, se aprecia que el grupo 4 es el que presenta mayor discrepancia, en donde el análisis de varianza indicó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos testigos y la prueba de Tukey indica que las diferencias son entre el grupo infectado al inicio (2) y el infectado en la semana 13 (4) ($P < 0.04$), y este último grupo con el grupo reinfectedo (3) ($P < 0.01$).

En lo que respecta a los grupos tratados con Nitroxinil, se observa que el fasciolicida disminuye sensiblemente la presencia del tremátodo. Lo cual es corroborado por el análisis estadístico que

FIGURA 1. RECUPERACION DE *F. hepatica*
CON NITROXINIL



se aplicó, en donde en todos los casos, cuando se contrastó al grupo testigo contra el grupo tratado, se determinaron diferencias significativas ($P < 0.01$).

En el Cuadro 2 se presenta la recuperación de fasciolas por sexo del ovino, en donde se analiza únicamente los tremátodos completos, apreciándose en la Figura 2 un patrón de comportamiento, ya que cuando los borregos son infectados en la primera semana y no son tratados (Gpo. 2) las hembras y los machos tienen un número similar de tremátodos, pero cuando el lote testigo es reinfectado (Gpo.3) las hembras en forma natural presentan una mayor oposición a la presencia del parásito, como se puede constatar por el número promedio y total de las fasciolas recuperadas.

Por el contrario cuando los animales son infectados, tratados y reinfectados (Gpos. 6 y 7), los machos responden mejor al fasciolicida y oponen mayor resistencia al tremátodo (promedio).

En el caso del Gpo.4 (infectados en la semana 13) se presenta un número similar de fasciolas en ambos sexos, mientras que la respuesta en el Gpo.8 no es clara, considerando que la recuperación fue escasa.

5.3. Tamaños y contrastes de las fasciolas recuperadas por grupo

En la Figura 3 se observa la longitud estimada de las fasciolas por grupo ($\mu \pm$ intervalo de confianza), en donde se aprecia que la

Cuadro 2. CANTIDAD Y TALLA DE Fasciola hepatica RECUPERADAS POR SEXO DE OVINOS TRATADOS CON NITROXINIL.

GRUPOS	SEXO	NUMERO DE OVINOS	FASCIOLAS RECUPERADAS		TAMAÑO (mm)	
			Promedio	Total	Promedio	D.E*
GRUPO 1 Control no infectado	♀	4				
	♂	3				
GRUPO 2 Control infectado	♀	3	41.0	123	23.28	2.67
	♂	4	36.75	147	22.67	2.57
GRUPO 3 Reinfectado semana 10	♀	4	29.75	119	27.46	2.89
	♂	3	63.66	191	27.76	2.59
GRUPO 4 Infectado semana 13	♀	3	15.66	47	17.23	3.53
	♂	3	15.33	46	22.52	2.68
* GRUPO 5 Tratado semana 5	♀	4	0.25	1		
	♂	3				
GRUPO 6 * Tratado semana 8 y reinfectado semana 10	♀	3	17.0	51	21.0	2.79
	♂	4	8.75	35	20.74	2.74
GRUPO 7 * Tratado semana 8 y reinfectado semana 13	♀	4	17.25	69	23.1	3.51
	♂	3	8.66	26	19.35	3.33
* GRUPO 8 Tratado semana 8	♀	3	0.33	1	17.0	
	♂	3	4.0	12	18.07	5.03

* Desviación estandar

FIGURA 2. FASCIOLAS RECUPERADAS POR SEXO DEL OVINO

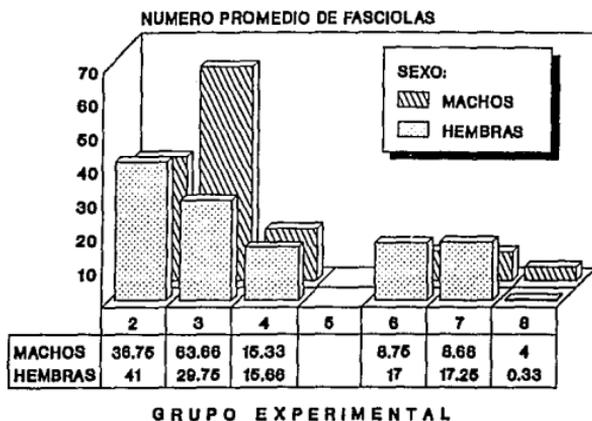
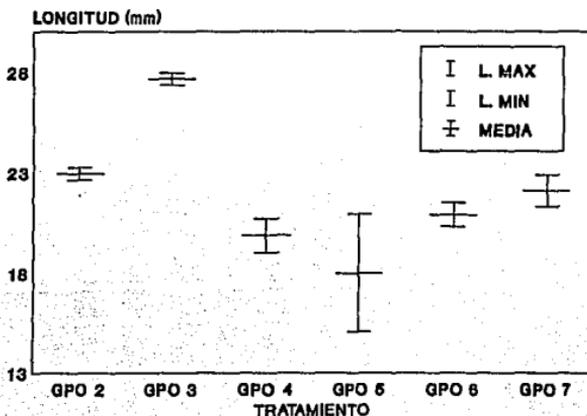


FIGURA 3. LONGITUD DE *F. hepatica* CON NITROXINIL (MEDIA \pm INTERVALO DE CONFIANZA)



mayor talla, corresponde al grupo testigo reinfestado, siguiendole en este orden el grupo testigo 2 y en menor escala en el grupo 4, este último muestra la mayor variabilidad de los grupos testigo. Los grupos tratados presentan menores tallas, pero una mayor variabilidad, sobre todo el grupo 5.

En la Figura 4 se describe la frecuencia por tallas de fasciolas de los grupos testigos, en donde el análisis indica diferencias significativas entre los tres grupos testigos ($P < 0.01$).

El grupo 2 (infectado solamente) mostró un rango en longitud de 18 a 29 mm, siendo la talla de 20 mm la más frecuente (49). En el grupo 3 (infectado y reinfestado) la longitud de fasciolas osciló entre 18 y 32 mm, en donde la mayoría de los parásitos (81) midieron 29 mm. En el grupo 4 (infectado en la semana 13) la talla osciló entre 11 y 27 mm, siendo la más frecuente de 22 mm (13), en este grupo se colectaron las menores tallas. Se observó que todas las fasciolas de los grupos testigo estaban sexualmente desarrolladas, considerándose como especímenes adultos.

En lo que respecta a las tallas de los tremátodos recuperados por sexo de los borregos de los grupos testigos ($\mu \pm$ desviación estándar), se aprecia en la Figura 5 que entre los grupos 3 y 4 se presentaron las mayores diferencias. En donde el sexo del borrego influyó en el desarrollo del parásito, ya que las borregas de este último grupo muestran diferencias significativas con las borregas del grupo 2 ($P < 0.03$) y las hembras y machos del grupo 3. Por

FIGURA 4. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS TESTIGOS INFECTADOS Y REINFECTADOS

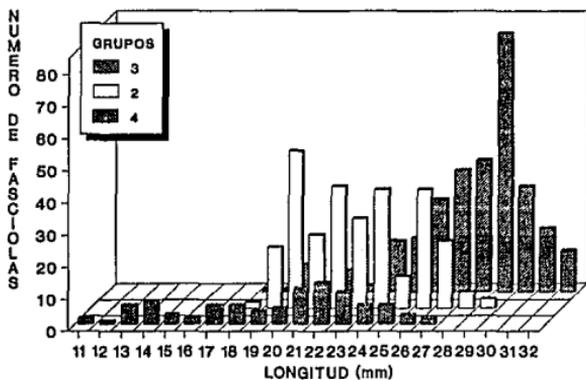
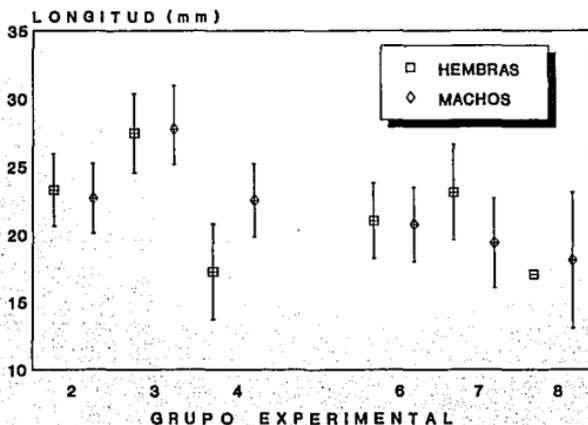


FIGURA 5. LONGITUD DE F. hepatica POR SEXO CON NITROXINIL (MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR)



último, el único grupo testigo en que se determinaron diferencias significativas entre los sexos, fue el grupo 4 ($P < 0.05$).

En la Figura 6 se compara el grupo 2 (testigo infectado) con el grupo 8, tratado en la semana 8, observándose que las tallas de las fasciolas colectadas de los grupos tratados oscilaron entre 17 y 22 mm, siendo más chicas que las del grupo testigo. Es pertinente hacer notar que en caso del grupo 5 solo se encontró un tremátodo el cual midió 18 mm. Se determinaron diferencias significativas ($P < 0.001$), con respecto al grupo testigo. Sin presentar ninguna relevancia el contraste por sexos en los grupos tratados.

En la Figura 7 se observa igualmente, que los parásitos del grupo 3 (testigo reinfectado) fueron más grandes en tamaño que los de los grupos 6 y 7 que recibieron tratamiento y reinfección. Manifestándose la influencia del tratamiento, en virtud de que siempre los tamaños de las fasciolas dosificadas en la misma fecha, fueron diferentes en talla y número a las del grupo testigo sin tratamiento. Además de ser corroborada por la prueba de Tukey, la cual indica, diferencias significativas ($P < 0.01$) entre el grupo testigo y los grupos 6 y 7, mientras que en estos últimos no se detectaron diferencias ($P > 0.05$). El contraste entre los sexos del hospedero indica que la mayor discrepancia es entre los machos del grupo testigo con las hembras del grupo 6 ($P < 0.02$) y con los machos del grupo 7 ($P < 0.01$), como se aprecia en la Figura 5.

FIGURA 6. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS INFECTADOS Y TRATADOS

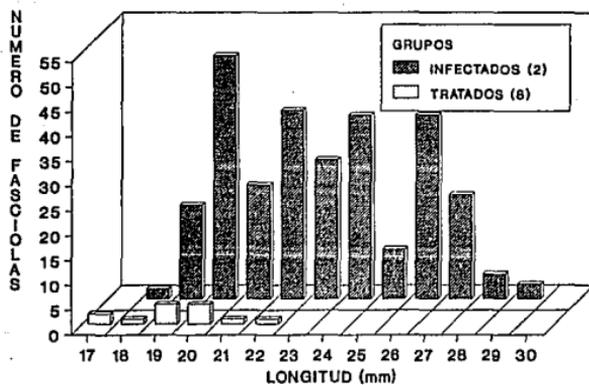
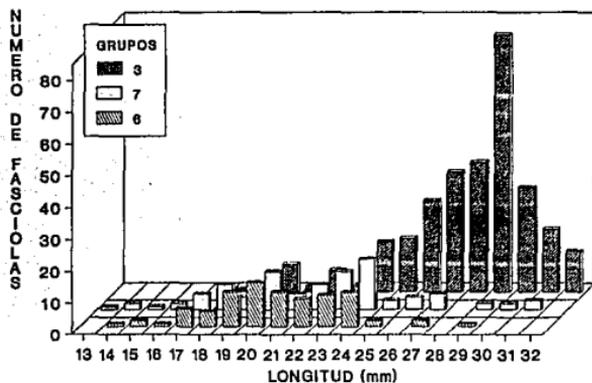


FIGURA 7. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS TRATADOS Y REINFECTADOS



El grupo 6 mostró un rango en longitud de 14 a 29 mm, siendo la talla de 20 mm la más frecuente (14) y en el grupo 7, la longitud de las fasciolas osciló entre 13 y 31 mm, en donde la talla más frecuente fue de 24 mm (16).

5.4. Evaluación inmunoenzimática.

Los sueros de los 56 animales experimentales fueron analizados individualmente durante todo el experimento y los valores promedio de cada grupo se muestran en las Figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Si los valores de densidad óptica se interpretan como una relación de proporción, es decir, a mayor densidad óptica mayor producción de anticuerpos, entonces se puede deducir lo siguiente:

En la Figura 8 se comparan los grupos testigos, en donde el grupo 2 mostró la mayor producción de anticuerpos de todos los grupos, manifestandose a partir de la semana 5 de postinfección, un sensible incremento de producción de anticuerpos, con respecto a los otros grupos testigos.

El grupo 3 produjo niveles más bajos de anticuerpos que el grupo 2 manteniendo estos valores mas homogéneos durante el estudio, aún después de haber sido reinfestado.

El grupo 4 produjo después de 13 semanas una respuesta leve de anticuerpos, manteniendo el mismo patrón dentro de las siguientes

FIGURA 8. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) ANTI - *F. hepatica* EN LOS LOS GRUPOS TESTIGOS

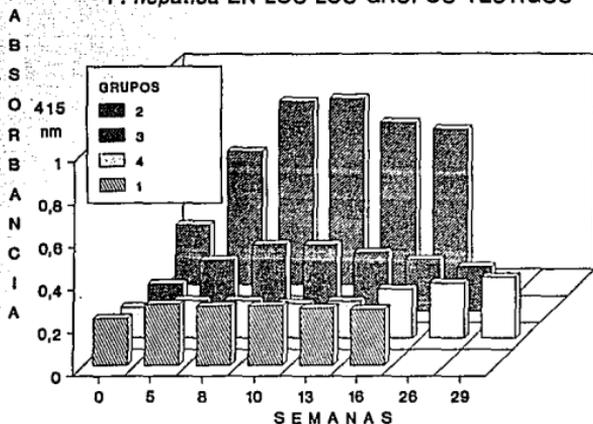
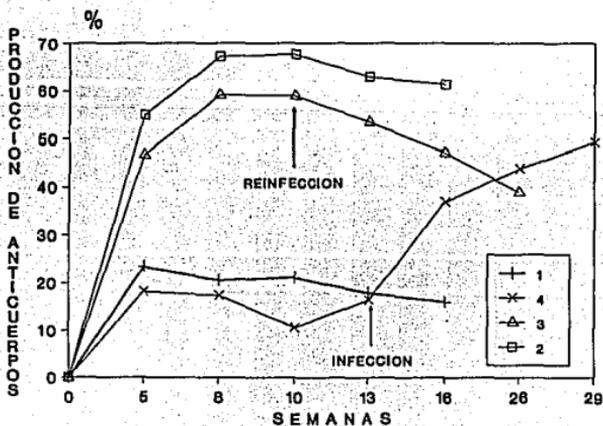


FIGURA 9. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) ANTI - *F. hepatica* EN LOS GRUPOS TESTIGOS



13 semanas, a partir de la infección el grupo respondió con un mayor incremento de anticuerpos, hasta el día del sacrificio.

Finalmente en el grupo 1, se aprecia un comportamiento similar al grupo 4, ya que no existía ningún factor para considerarlo distinto.

La Figura 9 muestra el incremento de la reacción inmunológica, expresado en por ciento (%) de los grupos experimentales, que a diferencia de la anterior figura, permite establecer los patrones de respuesta, con respecto a la semana 0.

En la figura se aprecian dos patrones, que corresponden a los grupos infectados al inicio (2 y 3) y a los grupos no infectados al inicio (1 y 4). De hecho, cada uno de los patrones son iguales. En el primer caso, la diferencia es hasta la semana 10, en donde el grupo 3 es re infectado; mientras que en el segundo caso, es cuando el grupo 4 es infectado en la semana 13, en ambos patrones se muestra que la mayor actividad de producción de anticuerpos, es en el intervalo del inicio del experimento hasta la semana 5.

El patrón de los grupos infectados al inicio, se comporta de manera similar, sin embargo, por alguna razón tiene una mayor producción de anticuerpos (se aprecia en la Figura 8), pero expresado en por ciento, se observa similar, hasta la semana 10, en donde el grupo es re infectado. Contradictoriamente, en las semanas posteriores a la reinfección, el grupo disminuye su producción de

anticuerpos. La figura parece indicar que la reinfección no causa una respuesta en la producción de anticuerpos, por el contrario, el grupo 2 disminuye su producción de anticuerpos, a partir de la semana 10, pero en menor proporción que el grupo 3.

El patrón de los grupos no infectados al inicio, muestra un comportamiento similar entre el grupo 1 y el 4. La respuesta inmunológica del grupo 4, es similar en las primeras semanas a las de los grupos infectados al inicio del experimento, sin ser tan intensa.

En la Figura 10 se contrasta los grupos 5 y 8, los cuales fueron tratados en las semanas 5 y 8, respectivamente. Se aprecia en la figura, como se esperaba, que los grupos tratados tuvieron una menor producción de anticuerpos, como se puede contrastar con el grupo 2.

El grupo 5 comenzó a producir anticuerpos gradualmente, incrementando su respuesta inmunológica y alcanzando su máximo nivel alrededor de la semana 8, posteriormente declinó en forma gradual hasta el sacrificio.

El grupo 8 se comportó de manera similar al anterior grupo, ya que comenzó a producir anticuerpos en forma gradual hasta la semana

FIGURA 10. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS Y NO INFECTADOS

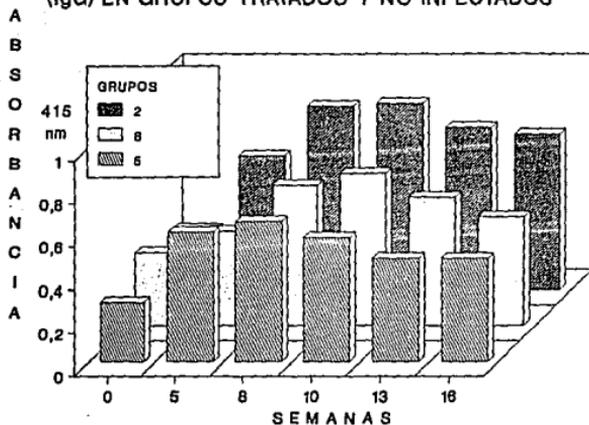
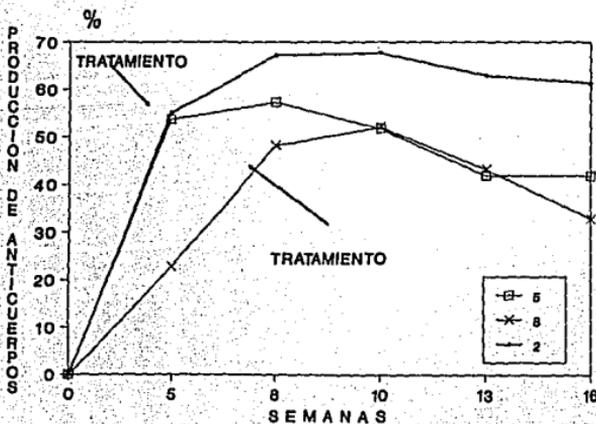


FIGURA 11. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS Y NO REINFECTADOS



8, en la cual se incrementó su respuesta inmunológica, alcanzando su máximo nivel alrededor de la semana 10, declinando en forma gradual, hasta el sacrificio.

En la Figura 11 se aprecia que tres semanas después de que son tratados el grupo 5 y 8 respectivamente, siguen incrementándose su producción de anticuerpos, posteriormente disminuyen su actividad. Otro aspecto interesante es que el grupo 5 respondió en forma similar al grupo testigo, hasta que es tratado en la semana 5, mientras que el grupo 8 no muestra esa capacidad de respuesta, ya que se esperaba un comportamiento parecido al testigo infectado, al menos durante las 8 primeras semanas.

En la Figura 12 se contrasta los grupos 6 y 7, los cuales fueron infectados, tratados y re infectados. Se aprecia que los grupos tratados y el testigo, presentaron un incremento general de anticuerpos alrededor de la semana 5 después de la infección. El grupo 7 tratado en la semana 8 presentó una disminución de anticuerpos entre las semanas 10 y 13 aumentando sus anticuerpos 3 semanas después, permaneciendo esta respuesta durante las 16 semanas posteriores, también se observa, que la producción de anticuerpos es similar a la del grupo control re infectado.

Es pertinente hacer notar que los valores de anticuerpos de los grupos tratados fueron más altos que los del grupo testigo, ya que la producción de anticuerpos permaneció constante y no parece haber inducido una gran respuesta inmunológica.

FIGURA 12. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS Y REINFECTADOS

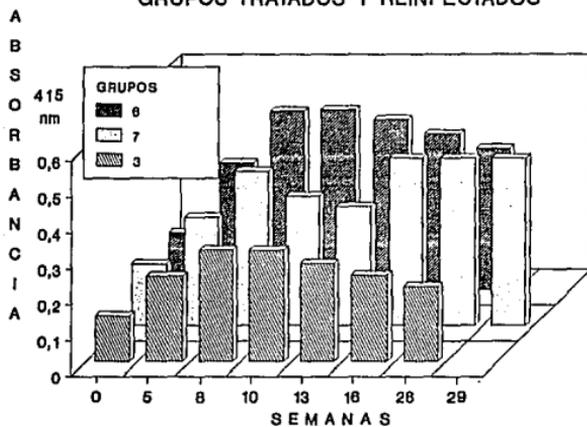
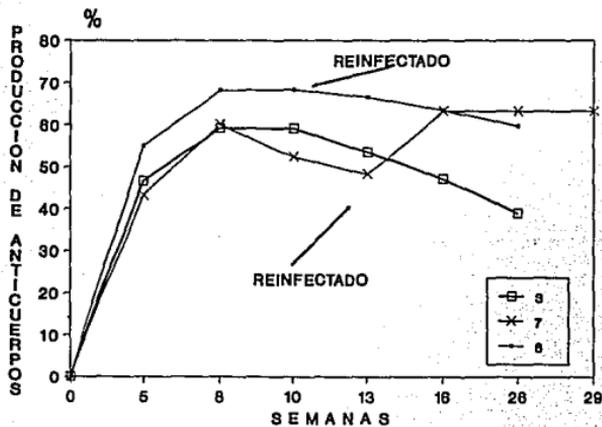


FIGURA 13. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS Y REINFECTADOS

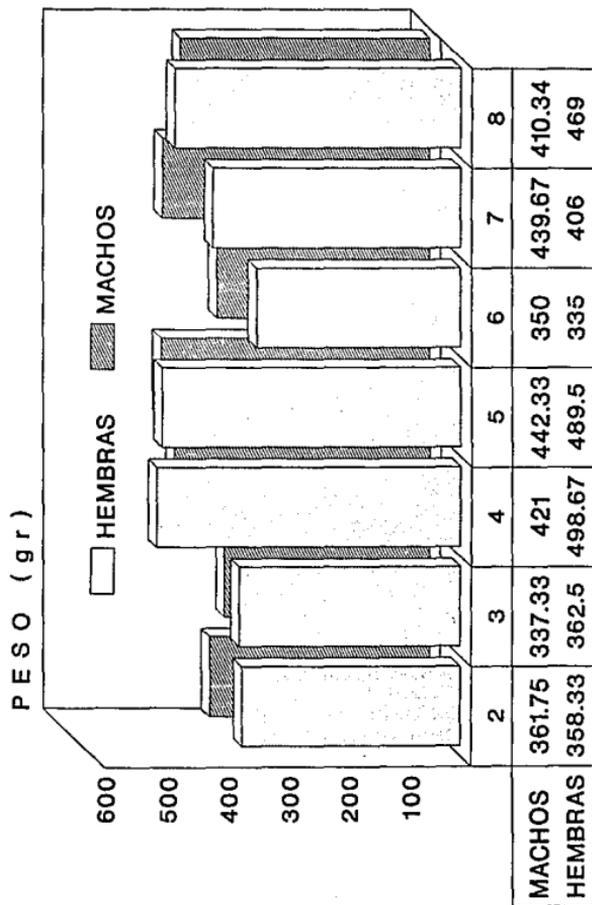


Con respecto al grupo 6, reinfestado 2 semanas después del tratamiento, parece indicar que hubo una estimulación de la producción de anticuerpos, ya que sus niveles son los más elevados. En la Figura 13 se aprecia que los tres grupos (tratados y no tratado) tuvieron una tendencia similar, ya que el incremento en respuesta inmunológica es hasta la semana 8, posteriormente declina la producción. El grupo 6 a diferencia del grupo 7, tuvo un ligero decremento en anticuerpos, a partir de la reinfestación, mientras que el grupo 7, disminuyó sensiblemente a partir de la reinfestación. El grupo testigo alcanzó su mayor producción de anticuerpos en la semana 8, posteriormente declina la producción.

5.5. Peso del hígado

Los datos obtenidos con relación al peso del hígado mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, siendo las mayores diferencias entre los grupos 5 - 7 ($P < 0.01$); los grupos 4 - 8 y 2 - 7 ($P < 0.02$); los grupos 1 - 7 y 5 - 3 ($P < 0.03$) y los grupos 2 - 3 ($P < 0.05$). Sin embargo; el análisis no aporta los suficientes elementos para demostrar que el peso del hígado es afectado por la abundancia de las fasciolas. De igual manera, el análisis no aporta la suficiente evidencia para mostrar que el peso del hígado por sexo de ovino es afectado en forma diferencial, como se puede apreciar en la Figura 14.

FIGURA 14. PESO PROMEDIO DEL HIGADO
POR SEXO DEL OVINO



GRUPO EXPERIMENTAL

5.6. Análisis coprológicos

En el Cuadro 3 se presenta el porcentaje de animales positivos al análisis fecal durante todo el estudio, en donde se aprecia que se detectaron huevos de *F hepatica* a partir de la semana 8, en los grupos que fueron infectados al inicio del experimento y no fueron tratados hasta antes de la citada semana, como son los grupos testigos (2 y 3), los grupos tratados y re infectados (6 y 7) y en el grupo infectado, tratado y sacrificado (8).

Los grupos testigo (2 y 3) alcanzaron el pico de liberación máxima en la semana 10 y permanecieron positivos hasta el sacrificio. La reinfección de los grupos 6 y 7 tratados y re infectados a las 2 y 5 semanas después del tratamiento respectivamente, no modificaron el porcentaje de positividad de los animales. También se observó que a partir de la semana 10 después de la infección, todos los borregos fueron diagnosticados como positivos a huevos de *F hepatica* a excepción de los grupos 1 y 5.

6. DISCUSION

6.1. Recuperación de fasciolas

Grupos testigo infectado y re infectado. Con relación a estos grupos se demostró que el número de fasciolas recuperadas de los grupos 2

CUADRO 3

PORCENTAJE DE ANIMALES POR GRUPO, POSITIVOS A HUEVOS DE
Fasciola hepatica MEDIANTE LA TECNICA DE SEDIMENTACION +

SEMANTAS		0	5	8	10	13	16	26	29
		+	+	+	+	+	+	+	+
G R U P O S	1	0	0	0	0	0	0		
	2	0*	0	29	100	100	100		
	3	0*	0	57	100*	100	100	100	
	4					0*	0	83	67
	5	0*	0T	0	14	14	0		
	6	0*	0	43T	57*	57	86	86	
	7	0*	0	57T	86	86*	43	86	100
	8	0*	0	57T	29	29	14		

+ = Los datos fueron ajustados al próximo número integral.

* = Infección o reinfección.

T = Semana de tratamiento con Nitroxinil.

y 4 juntos (49.5 y 20.6), fue muy similar a la registrada para el grupo testigo reinfestado (60.5).

Se esperaba que los grupos 2 y 4 tuvieran un número similar de fasciolas, en virtud de haber sido infectados con un número igual de metacercarias, sin embargo los resultados muestran que no fue así, ya que el grupo 4 presentó una menor cantidad de tremátodos. Con relación a este tópico, Ibarra et al (1988); Ibarra et al (1989) e Ibarra et al (1991) encontraron un 43.4, 32.0 y 24.3% de fasciolas recuperadas en ovinos infectados con metacercarias de *F. hepatica* respectivamente. Posiblemente, esta variable infectividad, pueda tener también relación con lo señalado por Smith (1987), quién estudió la dinámica de infección de caracoles lymneidos infectados con miracidios de *F. hepatica*; y menciona que existe una relación entre el número de miracidios/infección/caracoles/y por unidad de tiempo, parámetros que de alguna manera pueden inferir en la infectividad de metacercarias y por lo tanto en los porcentajes de recuperación de fasciolas, aún cuando el número de quistes dosificados sea el mismo.

Los resultados indican que mientras más maduro (edad) es el hospedero (borrego), es menos susceptible al daño que puede ocasionar la fasciola, como lo indica el hecho, de que el parásito crece poco y en menor abundancia.

El grupo 3 fue el que presentó mayor frecuencia del tremátodo y tuvo mejor evolución que los grupos testigos 2 y 4. Sin embargo la

reinfección aparentemente no modificó la producción de huevos de *F. hepatica*.

Las hembras de los ovinos presentaron mayor oposición a la presencia del parásito en los grupos 2 y 3 y el análisis estadístico confirmó que el sexo y la edad del animal influyen sobre la incidencia del tremátodo.

También se observó que no todas las fasciolas se desarrollaron bajo el mismo patrón, debido a la gran variabilidad de parásitos colectados entre un grupo y otro, teniendo diferencias promedio hasta de 11 mm en longitud.

Grupos infectados y tratados. Como se esperaba los tremátodos de los grupos tratados fueron colectados en menor cantidad. Del grupo 5 se recuperó únicamente una fasciola, mientras que en el grupo 8 fueron 18 fasciolas, hay que hacer notar, que casi todas fueron recuperadas en hospederos machos, pero no se puede asegurar que el Nitroxinil actué en forma diferencial sobre el sexo de ovino.

Grupos Infectados, Tratados y Reinfectedos. Los datos obtenidos demostraron que el tratamiento en los grupos 6 y 7 fue efectivo, ya que ambos grupos fueron serológicamente positivos en una proporción muy similar, en las semanas que se inició su tratamiento, a diferencia de los grupos anteriormente citados, en donde el Nitroxinil fue eficiente. El análisis de los grupos reinfectedos

indica evidencia para mostrar que los machos reaccionan mejor al tratamiento, ya que el grupo testigo reinfestado (3) muestra que en forma natural las hembras oponen mayor resistencia que los machos, es decir, hay más parásitos en los machos cuando no hay tratamiento y cuando son tratados los ovinos se recuperan más parásitos en las hembras. Indicando que Nitroxinil actuó en forma diferencial sobre el sexo del hospedero. Frayha et al (1971) y Larry et al (1981), demostraron que la incidencia de otras especies de helmintos está influenciada por el sexo del huésped. Estos hallazgos han sido recientemente confirmados analizando el crecimiento de *Fasciola gigantica* en ovinos (Knight, 1983). Los factores que inducen esta diferencia en la incidencia de helmintos en ovinos machos y hembras todavía no está comprendida pero podría deberse a la combinación de factores como sexo del huésped, composición genética, factores ambientales así como a los hábitos alimenticios del huésped o a las interacciones entre el huésped y el parásito. Así también en apoyo a que los huéspedes machos son más susceptibles a la infección por helmintos que los huéspedes hembras, como lo reportan Solomón, (1969); Mankau y Hamilton, (1972) y Reddington et al, (1981). De manera similar, en los bovinos, el sexo tiene influencia en la incidencia de fasciolas, como lo indica el mayor número de parásitos colectados en hembras que en los machos. (Aasanji y Williams, 1984).

6.2. Longitud de fasciolas

Grupos testigo infectado y re infectado. Se observó que el desarrollo del parásito en el huésped no fue similar entre los grupos infectados. En el grupo 2 las tallas de las fasciolas variaron de 18 a 29 mm, en el grupo 4 la longitud varió de 11 a 27 mm, mientras que el testigo re infectado varió de 18 a 32 mm, después de 26 semanas; este tipo de reducción en la talla concuerda con lo descrito por Doyle (1971, 1972). Sin embargo el retardo del crecimiento de fasciolas en hígados re infectados sugieren que existen mecanismos que producen resistencia contra las fasciolas.

El análisis indicó que las tres modalidades de infección reportó distintas condiciones para que se desarrollara el parásito en longitud, estimandose diferencias entre los tres grupos, siendo la mayor diferencia entre los grupos 3 y 4.

Un aspecto interesante es que el sexo del borrego influyó en la talla del parásito, ya que las hembras del grupo 4 mostraron diferencias con las hembras del grupo 2 y 3 y los machos de este último grupo. Por último, el único grupo en que se determinaron diferencias entre los sexos, fue en el grupo 4.

Grupos infectados y tratados. Las tallas encontradas mostraron que Nitroxinil eliminó las fasciolas más grandes o las adultas, reduciendo la evolución de los parásitos, como se demuestra en la

Figura 6, sin embargo, el crecimiento de las fasciolas más pequeñas parece no haber sido afectado; coincidiendo con Davis et al (1966) quien señala que Nitroxinil es eficaz contra fasciolas de 6 semanas en adelante

Grupos Infectados, Tratados y Reinfectedos. Los grupos 6 y 7 tuvieron fasciolas que oscilaban entre 22 y 24 mm en su mayoría, indicando que las fasciolas provenían de la primera infección y las más pequeñas de la segunda infección.

También se pudo apreciar que en los ovinos reinfectedos del grupo testigo, las fasciolas crecieron más rápido (mínimo 18 mm), que aquellas fasciolas provenientes del grupo testigo (mínimo 12 mm).

La presencia de fasciolas adultas parece haber favorecido a la migración de las juveniles y posiblemente esto pudiera ayudar a un desarrollo más rápido hacia el estado adulto.

Posterior al tratamiento la talla de las fasciolas de los grupos 5 y 6 tuvieron un número reducido de tremátodos adultos en el hígado, pareciendo ser similar (13 a 14 mm) a aquellos del grupo 4.

Con respecto al sexo de los hospederos, a pesar de estimar diferencias significativas entre los machos del grupo testigo con las hembras del grupo 6 y con los machos del grupo 7, no se puede asegurar que el sexo del ovino influyó en la respuesta al tratamiento por Nitroxinil.

6.3. Evaluación inmunoensimática.

Grupos testigo infectado y reinfectado. La respuesta de anticuerpos del grupo 2 fue la más alta de los 8 grupos, en donde el máximo nivel se alcanzó en la décima semana postinfección, declinando gradualmente y de manera general en las siguientes semanas, siguiéndole en este orden el grupo 3, sin alcanzar la respuesta del anterior grupo. Hubiera sido interesante el poder continuar con el monitoreo de sueros por varios meses hasta detectar la baja total de anticuerpos en algunos de los grupos con pocas fasciolas remanentes, ya que Sexton et al (1991), investigó la cinética de anticuerpos de *Fasciola hepatica* mediante ELISA en ovinos infectados durante 20 semanas, indicando que los niveles se mantuvieron en un nivel alto durante todo el estudio.

Un aspecto interesante es el relacionado con el incremento de la respuesta inmunológica, en el cual se manifiestan dos patrones. En el primer caso, lo constituyen los grupo 2 y 3, los cuales fueron infectados al inicio, la tendencia observada es similar y la diferencia se manifiesta en la semana 10, en donde el grupo 3 es reinfectado; mientras que en el segundo caso, lo constituyen los grupo 1 y 4, los cuales no fueron infectados al inicio y su comportamiento es muy similar, las diferencias se manifiestan cuando el grupo 4 es infectado en la semana 13. En ambos patrones se muestra que la mayor actividad de producción de anticuerpos, es en el intervalo del inicio del experimento hasta la semana 5.

En el grupo 3 infectado y re infectado en la semana 10 tuvo una cinética similar de anticuerpos al grupo 2, sin embargo no alcanzó sus niveles de producción de anticuerpos, aún cuando los animales hospedaron más parásitos. Este hecho, sugiere que posiblemente ocurra una inmunodepresión después de la semana 10, la cual detuvo la respuesta humoral y permitió a los parásitos re infectados a desarrollarse más rápidamente, expresado de otra manera, las fasciolas jóvenes fueron impulsadas a crecer más en el grupo re infectado que en el testigo sin re infección.

Grupos Infectados y Tratados. El grupo 5 (tratado a las 5 semanas) mostró un incremento bajo de anticuerpos, continuando así durante las 5 semanas después del tratamiento, posteriormente se observó un decremento del nivel de anticuerpos.

El grupo 8 (tratado a las 8 semanas) mostró un decremento de anticuerpos en las 2 semanas posteriores al tratamiento, continuando así hasta su sacrificio.

La respuesta inmunológica expresada en porciento, muestra que la capacidad de respuesta de los animales infectados, es mayor en medida que sea más joven, en donde el grupo 5 reaccionó mejor que el grupo 8.

Grupos Re infectados. En el grupo 3 (Testigo re infectado) se determinó un decremento de anticuerpos después de la semana 10,

siendo similar al grupo no infectado, sin embargo la infección fue eficiente, lo cual se comprueba por las tallas de fasciolas entre 18 y 22 mm.

Los grupos 3 y 6 fueron similares en cuanto a producción de anticuerpos y a la recuperación de fasciolas, así los anticuerpos producidos permanecieron constantes 2 o 3 semanas post-tratamiento.

También se observó que los grupos 3 y 6 presentaron un patrón de anticuerpos muy similar, alcanzando su máximo pico alrededor de la semana 10 y declinando en las semanas posteriores, indicando lo anterior, que las fasciolas tal vez modificaron la respuesta inmune durante las siguientes dos semanas, ya sea que hubiera o no fasciolas en varios estadios de actividad. De ahí que el sistema inmune no estaba activo a 5 semanas posteriores al tratamiento como se aprecia en el grupo 7 donde se observó un aumento de anticuerpos después de la reinfección. Estas observaciones sugieren que el tratamiento a las 8 o 10 semanas posteriores a la infección impiden la inmunomodulación negativa, inducida por las fasciolas adultas.

La respuesta inmunológica en porcientos muestra que la tendencia de los tres grupos re infectados (tratados y no tratado) es similar, con diferencias entre el grupo 6 y el 7. En donde el primer grupo disminuye ligeramente la actividad inmunológica y el segundo reacciona más rápido, produciendo una mayor cantidad de anticuerpos.

6.4. Peso del hígado.

El análisis no aportó la suficiente evidencia para demostrar que el peso del hígado, está en proporción directa con la presencia y abundancia del tremátodo, ya que si fuera así, entonces se esperaría que la mayor discrepancia fuera entre el grupo libre de fasciola (grupo 1) y el grupo reinfestado (grupo 3), que era el que reportó mayor abundancia del tremátodo, o tal vez con el grupo 2, que es después del grupo 3, el que presenta mayor número de fasciolas. El sexo del animal no influyó en la pérdida de peso del hígado.

6.5. Coproscopia.

Soulsby (1987) menciona que los huevos de *F. hepatica* en el ovino se liberan después de 8 semanas postinfección y los datos obtenidos en el análisis coprológico mostraron un patrón similar.

Todos los ovinos del grupo 5 tratados con Nitroxinil excepto uno, se determinaron como negativos a huevos de *F. hepatica* a la semana 13, demostrando Nitroxinil una alta eficacia contra fasciolas de 5 semanas de edad. En el caso del grupo 8, tratado a las 8 semanas postinfección, los animales fueron seropositivos siguiendo un decremento inmediato de la liberación de huevos permaneciendo así hasta el fin del experimento.

Fue notorio que Nitroxinil ejerció su eficacia muy similar a la forma previamente reportada por Rapic *et al* (1988) y Dobbins y Wellington (1982). Aquí es pertinente hacer notar la excepcional eficacia obtenida en el grupo 5 en la cual el compuesto redujo fasciolas en un 99.71%.

Los huevos de fasciola fueron liberados en ambos casos entre las 2 y 5 semanas posteriores al tratamiento. La liberación se incrementó gradualmente y permaneció alta hasta el fin del experimento. Aquí es importante señalar que en el caso de los ovinos, *F hepatica* puede permanecer hasta por 11 años, por lo que en el intervalo de tiempo en que este experimento fue programado se esperaba que la liberación de huevos, se mantuviera alta y constante.

Investigaciones futuras a través del desarrollo continuo de antígenos de *F hepatica* utilizando técnicas de Biología Molecular podrán conducir a métodos de serodiagnostico mejorados ampliamente aplicables y económicos contra la fasciolosis.

7. CONCLUSIONES

El fasciolicida Nitroxil demostró su efectividad en los grupos infectados, principalmente cuando es aplicado en borregos jóvenes (18 meses), además de ser muy eficiente contra fasciolas de 5 y 8 semanas de edad.

El experimento demostró que mientras más jóvenes son los animales, mayor es la posibilidad que *F hepatica* se instale en el hígado y los conductos hepáticos, causando daño al animal.

El sexo de los hospederos influye en la sensibilidad a la presencia de *F hepatica*, ya que en todos los casos de los grupos testigos, las mayores tallas del tremátodo correspondieron a hospederos machos. Mientras que en los grupos tratados y re infectados, corresponden las mayores tallas a los hospederos hembras (particularmente en el grupo re infectado en la semana 13 (grupo 7). Lo cual indica que el fasciolicida ejerce mayor control en los ovinos machos.

La reacción inmunológica es mayor en medida que el animal es joven (por lo menos 12 semanas), tal vez, para contrarrestar su sensibilidad a la presencia de la fasciola.

Se presentó una evolución paralela en la respuesta inmune del grupo testigo con relación a los otros grupos experimentales.

Cuando *F hepatica* alcanzó 8 semanas de edad, la respuesta inmune permaneció igual y obtuvo su máximo nivel en la décima semana; posteriormente declinó.

Al detenerse la evolución de las fasciolas mediante el tratamiento se puede apreciar 5 semanas después la recuperación de la habilidad del sistema inmune. Esto puede ser un interés colateral, ya que el tratamiento no sólo mata a las fasciolas que deprimen la habilidad del huésped para responder; otorgando la oportunidad al huésped para recuperar la respuesta inmune, cuando su habilidad no está presente a las dos semanas postratamiento.

8. RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE:

TRICLABENDAZOL

El promedio de parásitos colectados de los 63 borregos infectados, así como el porcentaje de reducción de fasciolas y su longitud, se encuentran descritas en el Cuadro 4, en donde se aprecia:

Se recuperaron 144 fasciolas de el Grupo 10 (testigo infectado) y 360 del Grupo 17 (testigo reinfectado). Los Grupos 11, 12, 13, 14, 15 y 16 tuvieron un total de 236, 182, 46, 97, 119 y 24 fasciolas respectivamente. El promedio de fasciolas encontradas por animal, fluctuó entre 3.4 hasta 33.7, siendo este último el promedio del lote de animales del grupo 11. El rango de parásitos encontrado por animal, osciló entre 0 y 65, los resultados muestran al igual que en la primera fase, una gran variabilidad, resultado de las condiciones naturales en que se desarrolló el experimento. Con relación a la longitud promedio de los tremátodos, se estimaron tallas entre 14.65 y 24.32 mm.

8.1 Eficacia antihelmíntica

La eficacia ejercida por Triclabendazol en términos de reducción de fasciolas para los grupos del 11 al 16 fue de 34.4, 49.4, 68.0, 73.0, 66.9 y 83.3%, respectivamente. Su eficacia fue demostrada contra grupos que no fueron reinfectados. Por el contrario, se registraron eficacias menos aceptables en los grupos tratados en la

Cuadro 4. EVALUACION DE LA INFECCION Y REINFECCION DE
Fasciola hepatica EN OVINOS TRATADOS CON TRICLABENDAZOL.

GRUPOS 7 ovinos / grupo 150 metacercarias / animal	FASCIOLAS RECUPERADAS			REDUCCION (%)	TAMANO long. x (mm)
	Total	Rango	Media D.E*		
Grupo 9 Control no infectado	---	---	---	---	---
Grupo 10 Control infectado semana 0	144	17 - 37	24.0 ± 7.84	---	21.09
Grupo 11 Tratado semana 5 Reinfectado semana 7	236	15 - 65	33.7 ± 17.58	34.44	15.70
Grupo 12 Tratado semana 5 Reinfectado semana 10	182	8 - 49	26.0 ± 13.83	49.44	16.66
Grupo 13 Tratado semana 5	46	0 - 22	6.5 ± 6.11	68.06	23.18
Grupo 14 Tratado semana 8 Reinfectado semana 10	97	0 - 27	13.8 ± 7.88	73.06	14.65
Grupo 15 Tratado semana 8 Reinfectado semana 13	119	1 - 26	17.0 ± 8.86	66.94	17.63
Grupo 16 Tratado semana 8	24	0 - 14	3.4 ± 5.71	83.33	22.08
Grupo 17 Control infectado semana 13	360	6 - 40	6.0 ± 9.04	---	24.32

* Desviación Estandar.

semana 5 y re infectados en la semanas 7 y 10, registrandose mayor eficacia sobre las fasciolas adultas de 8 semanas, que en los grupos tratados en la semana 8 (Cuadro 4).

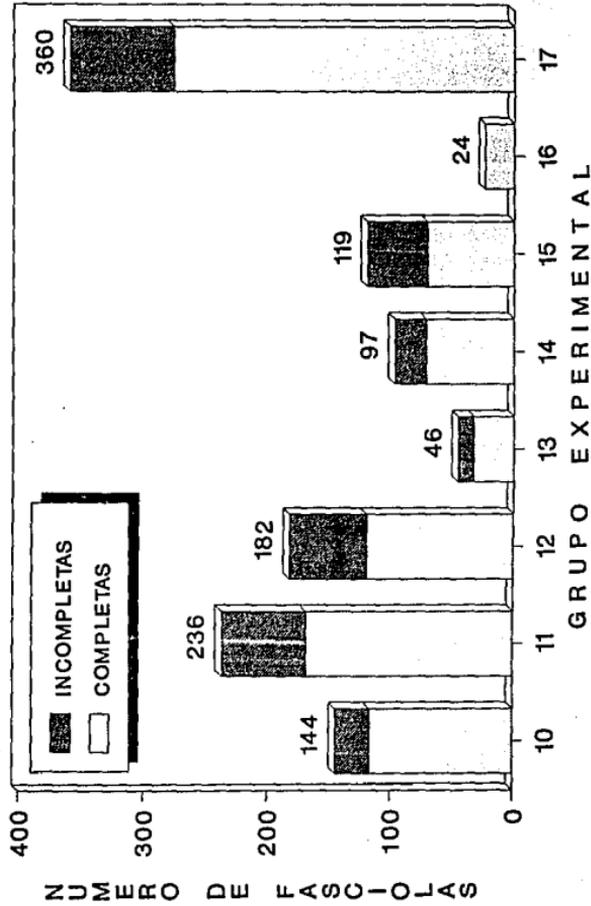
8.2 Recuperación de fasciolas

La Figura 15 muestra la recuperación de fasciolas de los grupos tratados con Triclabendazol en relación a los grupos testigos, así como el número de fasciolas recuperadas completas e incompletas. Ratificandose que el grupo re infectado (17) es el lote de animales donde se presenta el mayor número de fasciolas.

Los grupos testigos (10 y 17) presentaron diferencias significativas ($P < 0.001$), como se aprecia en la figura. En lo que respecta a los grupos tratados con Triclabendazol, se observa que el fasciolicida disminuye la presencia del tremátodo en los grupos tratados en la semana 5 y 8 (13 y 16 respectivamente) y en menor proporción en los grupos tratados en la semana 8 y re infectados en la semana 10 y 13 (14 y 15 respectivamente), siendo los grupos 11 y 12 donde se registró la menor eficacia.

En el Cuadro 5 se presenta la recuperación de fasciolas por sexo del ovino, analizandose únicamente los tremátodos completos, observandose en la Figura 16, que las hembras oponen mayor resistencia a la presencia del parásito en forma natural, como se pueden constatar por el número promedio y total de las fasciolas recuperadas de los grupos testigos (10 y 17) y en todos los grupos

FIGURA 15. RECUPERACION DE *F. hepatica*
CON TRICLABENDAZOL.



Cuadro 5. CANTIDAD Y TALLA DE Fasciola hepatica RECUPERADAS POR SEXO DE OVINOS TRATADOS CON TRICLABENDAZOL.

GRUPOS	SEXO	NUMERO DE OVINOS	FASCIOLAS RECUPERADAS		TAMAÑO (mm)	
			Promedio	Total	Promedio	D.E*
Grupo 9	♀	2	-----	-----	-----	-----
Control no infectado	♀	5	-----	-----	-----	-----
Grupo 10	♀	2	16.0	32	21.91	4.40
Control infectado semana 0	♂	4	21.0	84	20.77	7.36
Grupo 11	♀	2	16.5	33	16.97	2.93
Tratado semana 5	♂	5	27.0	135	15.39	3.18
Reinfectado semana 7						
Grupo 12	♀	2	7.5	15	14.13	2.42
Tratado semana 5	♂	5	20.8	104	17.03	4.59
Reinfectado semana 10						
Grupo 13	♀	2	-----	-----	-----	-----
Tratado semana 5	♂	5	6.6	33	23.18	6.56
Grupo 14	♀	2	4.0	8	12.75	1.71
Tratado semana 8	♂	5	12.8	64	14.89	3.14
Reinfectado semana 10						
Grupo 15	♀	2	5.0	10	17.0	2.32
Tratado semana 8	♂	5	12.2	69	17.74	3.03
Reinfectado semana 13						
Grupo 16	♀	2	-----	-----	-----	-----
Tratado semana 8	♂	5	4.8	24	22.08	7.75
Grupo 17	♀	2	40.0	80	25.92	3.84
Control infectado semana 13	♂	4	49.0	196	23.35	4.97

* Desviación estandar.

en donde los animales fueron expuestos al triclabendazol (11, 12, 13, 14, 15 y 16).

8.3 Tamaños y contrastes de las fasciolas recuperadas por grupo

En la Figura 17 se observa la longitud estimada de las fasciolas por grupo (media \pm intervalo de confianza), en donde se aprecia que la mayor talla, corresponde al grupo testigo reinfestado (17), siguiendole en este orden el grupo tratado en la semana 5 (13) y en menor escala en el grupo tratado en la semana 8 (16), este último muestra la mayor variabilidad de los grupos experimentales. Los grupos reinfestados presentan las menores tallas, pero un mayor número de tremátodos, sobre todo el grupo 11 y 12.

En la Figura 18 se observa la frecuencia por tallas de fasciolas de los dos grupos testigos, en donde el análisis indica que existe diferencias significativas entre los grupos testigos ($P < 0.01$).

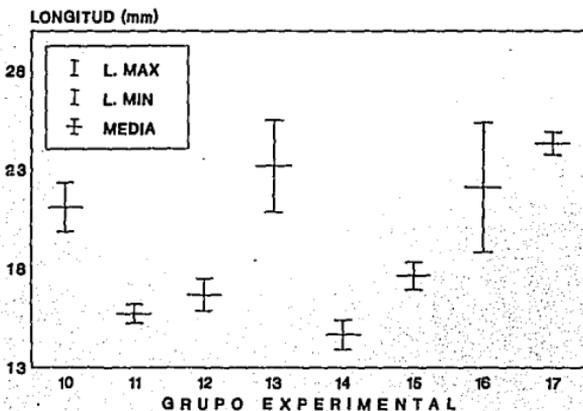
El grupo 10 (infectado solamente) mostró un rango en longitud de 7 a 30 mm, siendo la talla de 25 mm la más frecuente (16). En el grupo 17 (infectado y reinfestado) la longitud de fasciolas osciló entre 9 y 30 mm, en donde la mayoría de los parásitos (38) midieron 28 mm. Al igual que en la anterior evaluación, se observó que todas las fasciolas de los grupos testigo estaban sexualmente desarrolladas, considerandose como especímenes adultos.

En lo que respecta a los tremátodos recuperados por sexo de los borregos de los grupos testigos (media \pm desviación estandard), se

FIGURA 16. FASCIOLAS RECUPERADAS POR SEXO DEL OVINO



FIGURA 17. LONGITUD DE FASCIOLAS CON TRICLABENDAZOL (MEDIA ± INTERVALO DE CONFIANZA)



aprecio en la Figura 16 que las fasciolas recuperadas en las hembras presentaron un menor número de parásitos, pero en la Figura 19 se observa que tienen mayores tallas y menor variabilidad (media \pm desviación estandar), que las fasciolas recuperadas en los machos. En donde el sexo del borrego influyó en el desarrollo del tremátodo, ya que se determinaron diferencias significativas en la longitud de los sexos de los grupos testigos ($P < 0.01$). La tallas registradas fluctúan entre 7 y 30 mm.

En la Figura 20 se comparan los grupos tratados en la semana 5, siendo el grupo 13 únicamente infectado y los grupos 11 y 12 re infectados. Se observa un pobre espectro residual del fasciolicida, ya que los grupos re infectados muestran la presencia del tremátodo, estimandose diferencias significativas entre el grupo tratado únicamente y el grupo re infectado en la semana 7 ($P < 0.001$) y entre los grupos re infectados ($P < 0.001$). En donde el sexo del hospedero que presentó mayores diferencias fue en los machos del grupo 13, con las hembras y los machos de los otros dos grupos experimentales ($P < 0.001$), como se aprecia en la Figura 19.

El grupo 11 mostró un rango en longitud de 8 a 25 mm, siendo la talla de 21 mm la más frecuente (16) y en el grupo 12, la longitud de las fasciolas osciló entre 8 a 30 mm, en donde la talla más frecuente fue de 14 mm (19), mientras que las tallas de las fasciolas colectadas del grupo 13 oscilaron entre 10 y 30 mm, siendo las tallas más frecuentes de 28 y 30 mm (5). Se observa que los parásitos más pequeños fueron los del grupo 11 (re infectado en

FIGURA 18. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GPOS. TESTIGOS INFECTADOS Y REINFECTADOS

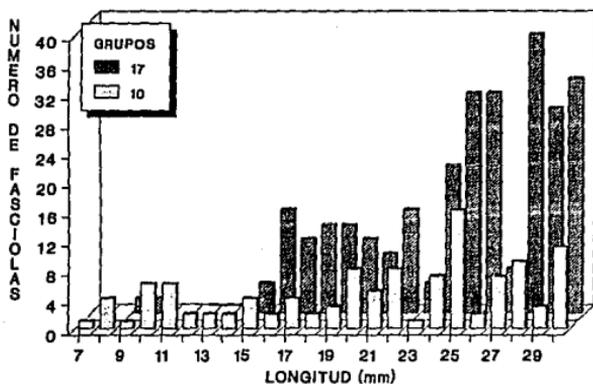
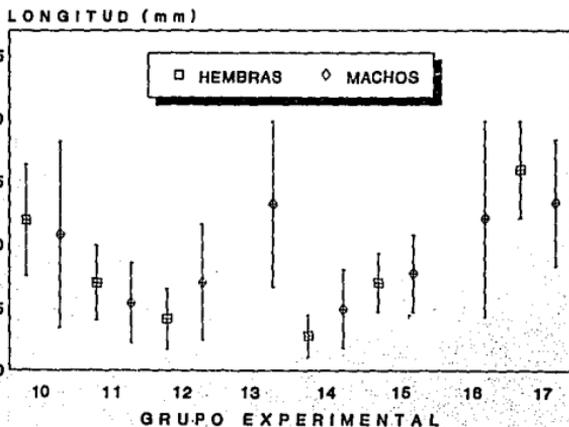


FIGURA 19. LONGITUD DE *F. hepatica* POR SEXO CON TRICLABENDAZOL (MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR)



la semana 7), mientras que los grupos 12 y 13 registraron tamaños similares.

En la Figura 21 se comparan los grupos tratados en la semana 8, siendo el grupo 16 únicamente infectado y los grupos 14 y 15 re infectados. Al igual que en la anterior figura, se observa el escaso efecto residual del fasciolicida, ya que los grupos re infectados muestran la presencia del tremátodo. Únicamente las diferencias radican en la semana de infección (adultos) y como consecuencia una menor infectividad de las metacercarias.

Se determinó diferencias significativas entre el grupo tratado únicamente y los grupos re infectados ($P < 0.01$) y entre los grupos re infectados ($P < 0.01$). El sexo del hospedero que presentó mayor discrepancia fue en los machos del grupo 16, con las hembras y los machos de los otros dos grupos experimentales ($P < 0.001$).

El grupo 14 mostró un rango en longitud de 10 a 24 mm, siendo la talla de 15 mm la más frecuente (17) y en el grupo 15, la longitud de las fasciolas osciló entre 10 a 23 mm, en donde la talla más frecuente fue de 20 mm (15), mientras que las tallas de las fasciolas colectadas del grupo 16 oscilaron entre 10 y 30 mm, siendo las tallas más frecuentes de 30 mm (5).

La Figura 22 muestra la comparación de longitud de fasciolas entre el grupo testigo infectado (10) y los grupos tratados en la semana 5 y 8 respectivamente (13 y 16). En donde se aprecia la eficacia

FIGURA 20. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS TRATADOS EN LA SEMANA 5

JUVENILES

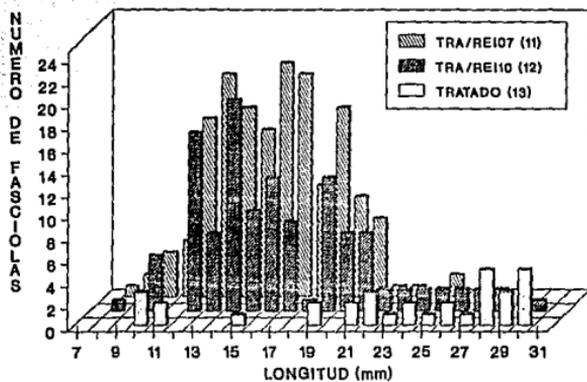
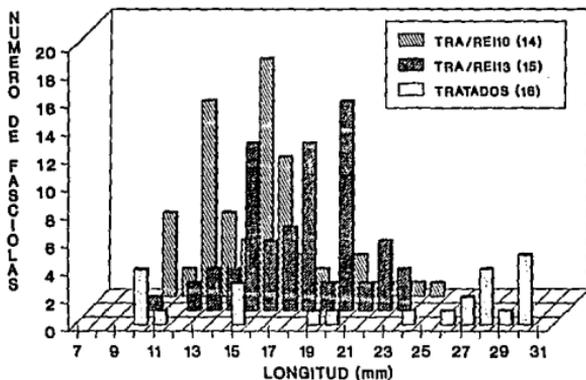


FIGURA 21. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS TRATADOS EN LA SEMANA 8

ADULTAS



del fasciolicida, ya que el grupo 16 mostró una baja cantidad de fasciolas (24) con una talla promedio de 22.08, oscilando la mayoría de las tallas entre un rango de 10 a 30 mm. En el caso del grupo 13, se observó una mayor cantidad de tremátodos (46) y una talla promedio de 23.18 mm.

La comparación entre los grupos 10 y 13, indica que aparentemente las fasciolas afectadas por el antihelmíntico se encontraban más desarrolladas (adultas) y más grandes que las juveniles del grupo 16. En donde los parásitos remanentes después del tratamiento, fueron capaces de alcanzar una talla más grande, alcanzando algunos de ellos entre 26 y 30 mm. El crecimiento fue similar a las fasciolas del grupo 13. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre el grupo testigo y los grupos tratados ($P > 0.05$) y entre estos últimos.

La distribución de tallas de fasciolas en el grupo testigo infectado indica un rango entre 7 y 30 mm, siendo la talla más frecuente de 25 mm (16).

La Figura 23 muestra la abundancia de los grupos tratados y reinfectados, con respecto al grupo 17. Como era de esperarse el fasciolicida controló la acción del parásito, el cual fue corroborado por el análisis, indicando diferencia significativas con respecto a los grupos tratados ($P < 0.001$).

Los grupos tratados en la semana 5 (11 y 12) mostraron una mayor cantidad de parásitos, pero tallas parecidas, de hecho no existió diferencia significativa entre los grupos tratados ($P < 0.05$). El

FIGURA 22. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS INFECTADOS Y TRATADOS

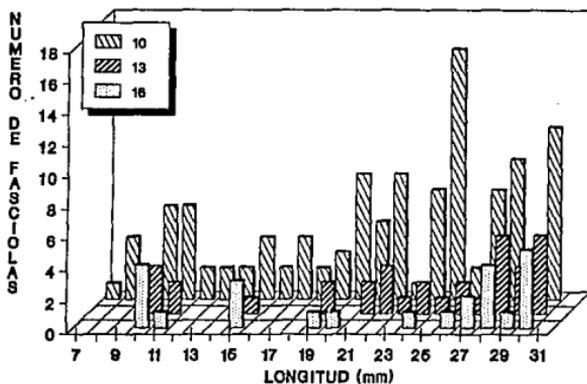
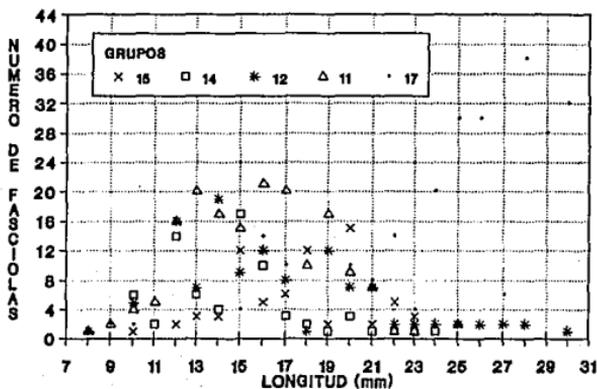


FIGURA 23. FRECUENCIA POR TALLAS EN LOS GRUPOS TRATADOS Y REINFECTADOS



grupo testigo muestra mayor cantidad y tallas de fasciolas, en donde se aprecia que la mayor parte de las tallas se distribuyen entre 24 y 30 mm.

8.4. Evaluación inmunoenzimática.

Los sueros de los 63 animales experimentales fueron analizados individualmente durante todo el experimento y los valores promedio de cada grupo se muestran en las Figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33. Los resultados más relevantes son:

En la Figura 24 se comparan los grupos 9, 10 y 17, los cuales constituyen el testigo no infectado, el testigo infectado al inicio del experimento y el testigo reinfectado, respectivamente.

El grupo 10 mostró la mayor producción de anticuerpos de los grupos testigos, manifestandose a partir de la semana 5 postinfección, un sensible incremento en la producción de anticuerpos, la actividad se mantuvo constante desde la semana 8 hasta el sacrificio del lote de animales.

El grupo 17 produjo niveles más bajos que el grupo 10, manteniendo estos valores mas homogéneos durante el estudio, aún después de haber sido reinfectado.

El grupo 9 mantuvo el mismo patrón durante las 16 semanas de la evaluación.

La Figura 25 muestra el incremento de la reacción inmunológica, expresado en por ciento (%) de los grupos experimentales, que a diferencia de la anterior figura, permite establecer los patrones de respuesta, con respecto a la semana 0.

En la figura se aprecia que la reacción inmunológica para los testigos infectados es similar, en donde la mayor actividad corresponde en el intervalo del inicio de la evaluación a la semana 5.

El comportamiento inmunológico de los testigos infectados es similar, siendo distinto a partir de la reinfección del grupo 17 en la semana 10. La figura indica que la reinfección no causa una respuesta en la producción de anticuerpos, por el contrario, el grupo 17 disminuye su producción de anticuerpos, a partir de la semana en que es re infectado.

En la Figura 26 se contrasta los grupos relacionados con las fasciolas en los estadios juveniles, en los grupos 11 y 12, los cuales fueron tratados en las semana 5 y re infectados en las semanas 7 y 10, respectivamente. Además del grupo 13, el cual es únicamente tratado en la semana 5.

Se aprecia en la figura, que el grupo 11 es el que tiene mayor actividad hasta la semana 7 en la que es re infectado el lote de animales, disminuye en la semana 8 y se incrementa la respuesta inmunológica desde la semana 13 hasta la finalización de la evaluación.

FIGURA 24. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) ANTI - *F. hepatica* EN LOS GRUPOS TESTIGOS

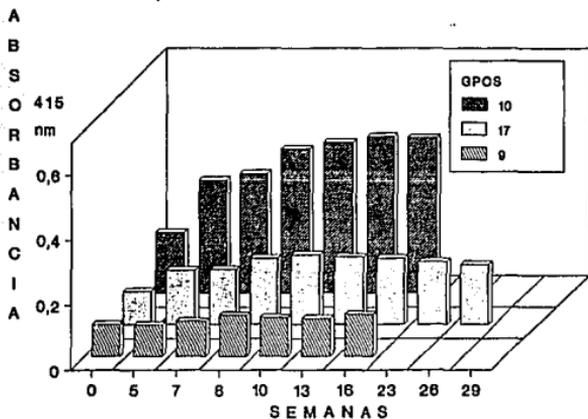
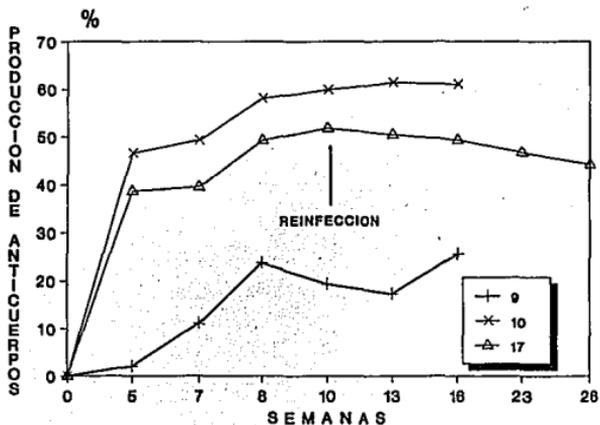


FIGURA 25. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) ANTI - *F. hepatica* EN LOS GRUPOS TESTIGOS



En el grupo 12 se esperaría una reacción similar al grupo 11, al menos durante las primeras 7 semanas, sin embargo los valores difieren sensiblemente. Un aspecto interesante es que el grupo no reacciona produciendo anticuerpos cuando es re infectado en la semana 10, siendo hasta la semana 16 en donde incrementa su actividad.

El grupo 13 muestra una actividad similar al grupo 11, hasta la semana 7, que indica que el organismo ya no esta produciendo anticuerpos con la misma intensidad, ya que el grupo fue tratado en la semana 5.

La Figura 27 muestra más claro la relación citada anteriormente, en donde se aprecia que los tres grupos tienen un comportamiento similar (tendencia) hasta la semana en que los grupos son tratados, en donde el grupo 12 tiene una mayor actividad en proporción, tal vez sea la razón que determinó menor incidencia del tremátodo (182), que el grupo 11 (236). A pesar de ser re infectado no aumenta su producción sensiblemente, de hecho su comportamiento es similar al grupo 13.

En la Figura 28 se contrastan los grupos relacionados con las fasciolas adultas, (grupos 14 y 15), los cuales fueron tratados en las semana 8 y re infectados en la semanas 10 y 13, respectivamente. Además del grupo 16, el cual es únicamente tratado en la semana 8.

FIGURA 26. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS EN LA SEMANA 5 JUVENILES

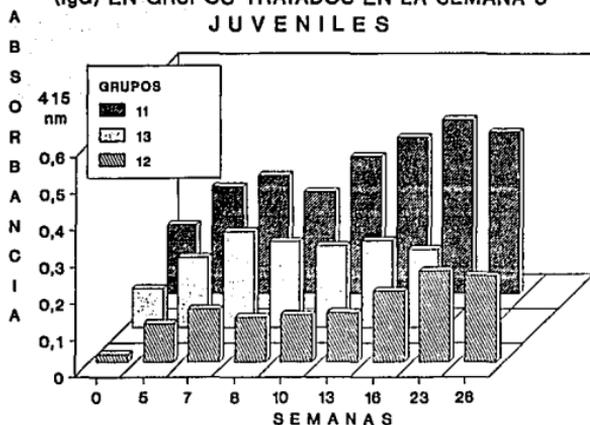
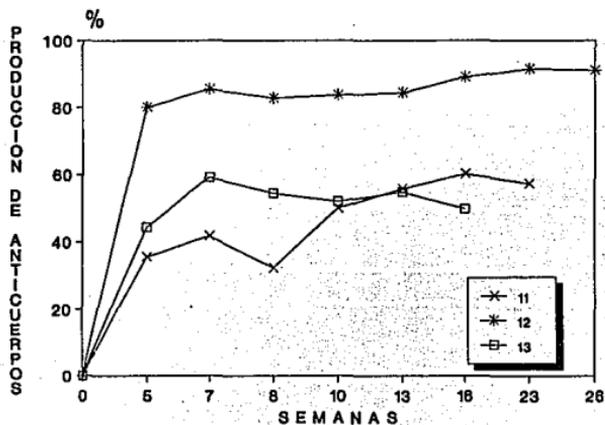


FIGURA 27. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS EN LA SEMANA 5



Se aprecia en la figura, que el grupo 14 es el que tiene mayor actividad hasta la semana 10 en la que es re infectado el lote de animales, disminuye en la semana 13 y se conserva la respuesta inmunológica hasta la finalización de la evaluación.

En el grupo 15 tiene una actividad parecida al grupo 16, aunque su respuesta es ligeramente mayor en la producción de anticuerpos, a pesar de ser re infectado, no aumenta sensiblemente su producción. En el caso del grupo 16 la actividad va en aumento en forma gradual y no se manifiesta mayor incremento, cuando el lote de animales es tratado.

La Figura 29 muestra que los tres grupos tienen un comportamiento similar en las primeras 7 semanas, a partir de la reinfección se notan diferentes. El grupo 16 muestra un comportamiento gradual, como se señaló anteriormente y los otros dos grupos no muestran un patrón que se pueda interpretar.

En la Figura 30 se contrastan los grupos tratados en la semana 5 y 8, contra el grupo testigo, en donde se aprecia que el grupo que no es tratado tienen mayor producción de anticuerpos, siendo muy parecido el comportamiento de los grupos tratados, con la diferencia que resultó más eficiente el tratamiento en la semana 8 (grupo 16). Fue notorio que aún cuando la mayoría de fasciolas fueron removidas por el antihelmíntico los niveles de anticuerpos permanecieron constantes hasta el tiempo de sacrificio de los

FIGURA 28. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS EN LA SEMANA 8 ADULTAS

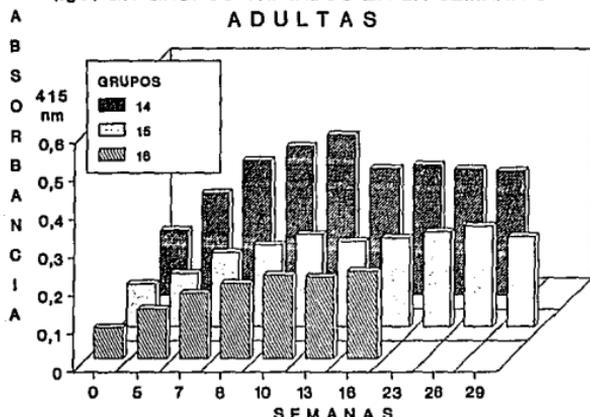
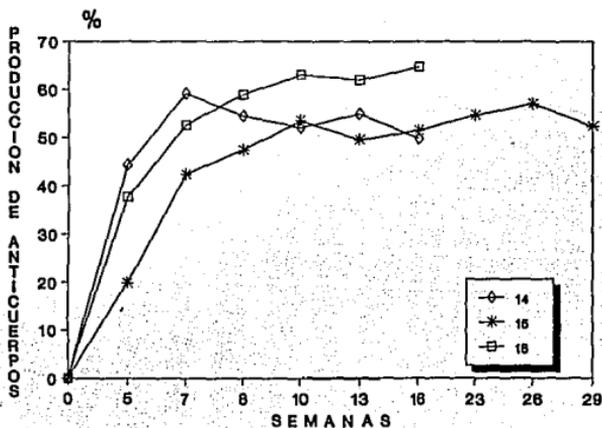


FIGURA 29. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS EN LA SEMANA 8



animales. Como era de esperarse el grupo testigo 10 tuvo un nivel más alto de anticuerpos hasta el final del experimento.

La Figura 31 muestra un comportamiento similar de los tres grupos hasta la semana 5, en donde el grupo testigo disminuye su acción inmunológica, mientras que los grupos tratados la mantienen hasta la semana 7, disminuyendo su actividad el grupo tratado en la semana 5, en tanto que el grupo 16 mantiene gradualmente su actividad.

En la Figura 32 se aprecia que el grupo 14, fue el que tuvo la mayor producción de anticuerpos, desde la segunda semana y mantuvo el nivel hasta la semana 10, en donde es re infectado, pareciera que esta acción inhibiera la capacidad de respuesta del grupo.

El grupo 12 fue el que tuvo una menor producción de anticuerpos, mostrando su más alto nivel en la semana 23, decreciendo ligeramente hasta el final del estudio. Se esperaba que este grupo tuviera una mayor actividad, considerando que es re infectado.

El grupo 15 fue el que reportó mayor similitud con el grupo testigo (17), siendo la diferencia más relevante, el momento de la re infección, en la cual el grupo reaccionó y aumento su producción de anticuerpos, mientras el grupo 17 conservó su tendencia.

El grupo 11 reaccionó como el grupo 14 en la producción de anticuerpos, incluso mejor, pero a partir de la semana 5 en que es

FIGURA 30. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN LOS GRUPOS INFECTADOS Y TRATADO

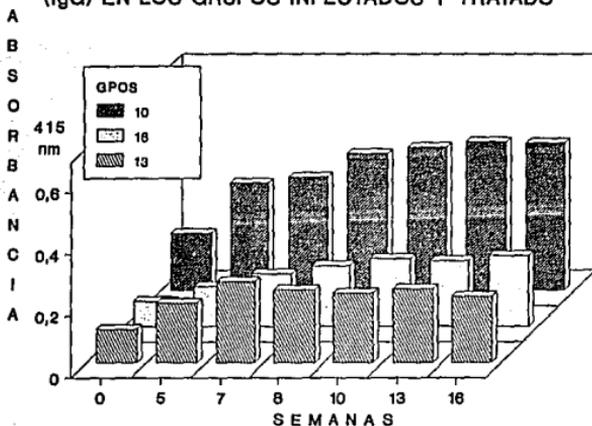
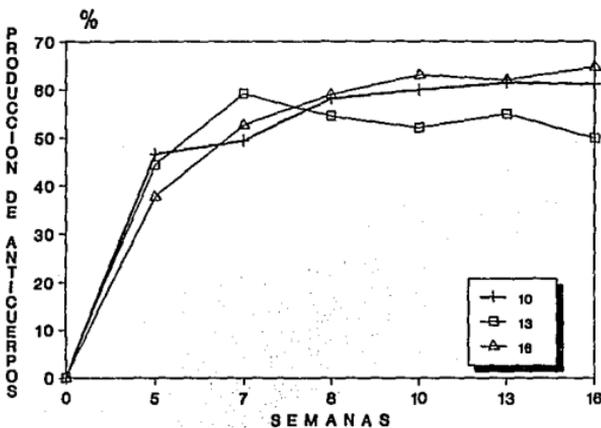


FIGURA 31. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS INFECTADOS Y TRATADOS



tratado, disminuye su ritmo productivo, notándose un decremento cuando es reinfectado, para posteriormente renovar su actividad.

La Figura 33 indica que el grupo 12 fue el que en proporción conservo mejor su actividad inmunológica, a partir de la semana 5, en que fue tratado el grupo y aumenta su actividad ligeramente, cuando es reinfectado.

El grupo 11 a partir de la semana en que es tratado, disminuye su actividad y en la semana 8 se encuentra la menor respuesta, aumentado cuando el grupo es reinfectado.

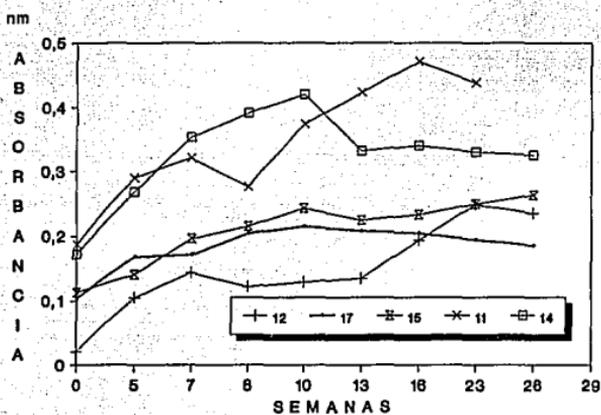
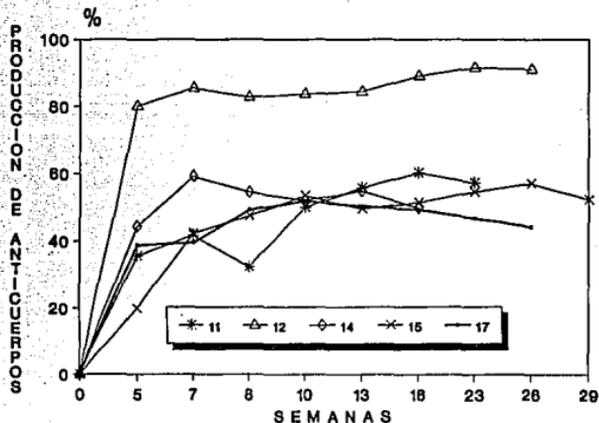
El grupo 14 muestra la mayor respuesta en la semana 7, disminuye en la semana 8, cuando es tratado y posteriormente se conserva su respuesta inmunológica hasta su sacrificio.

El grupo 15 aumenta su respuesta inmunológica en forma gradual, hasta la semana 16, en donde se observa una ligera disminución en su producción de anticuerpos.

8.5 Peso del hígado

Los datos obtenidos con relación al peso del hígado mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P < 0.001$), siendo el grupo que fue tratado en la semana 5 y reinfectado en la semana 7 (grupo 11), el que muestra mayor

415

FIGURA 32. DETERMINACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS Y REINFECTADOS

FIGURA 33. FLUCTUACION DE ANTICUERPOS (IgG) EN GRUPOS TRATADOS Y REINFECTADOS


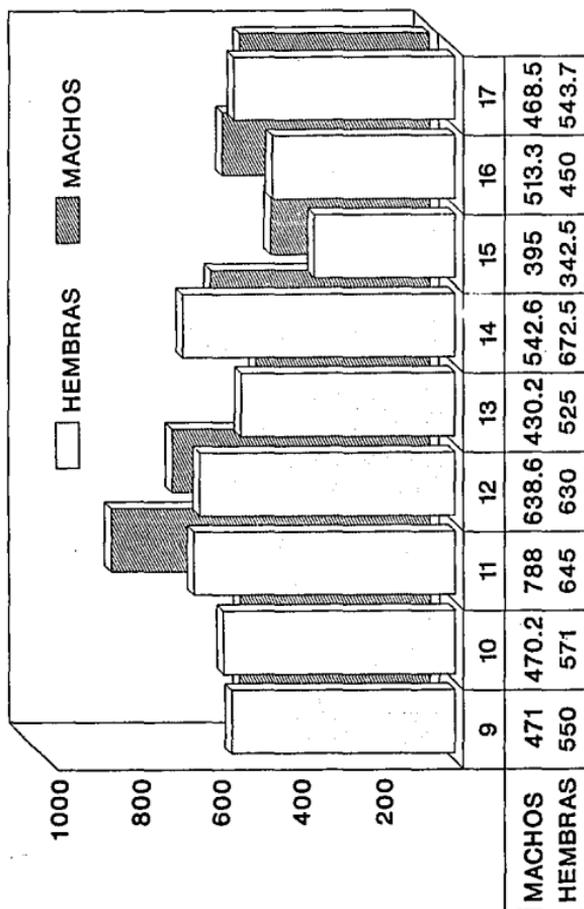
discrepancia con los grupos 9, 10, 14, 15 y 16 ($P < 0.01$); el grupo 12 con el grupo 10 y 15 mostraron significancia ($P < 0.05$).

Al igual que en la evaluación del Nitroxinil, el análisis del peso del hígado no aporta la suficiente evidencia para mostrar que el hígado es afectado debido al sexo del animal, como se aprecia en la Figura 34.

8.6 Análisis coprológicos

En el Cuadro 6 se presenta el porcentaje de animales positivos al análisis fecal durante todo el estudio. En donde se aprecia que se detectaron huevos de *F hepatica* en el grupo 13, específicamente en dos borregos, estando el resto de los borregos negativos hasta su sacrificio.

FIGURA 34. PESO PROMEDIO DEL HIGADO
POR SEXO DEL OVINO



GRUPO EXPERIMENTAL

C U A D R O 6

PORCENTAJE DE ANIMALES POR GRUPO, POSITIVOS A HUEVOS DE
Fasciola hepatica MEDIANTE LA TECNICA DE SEDIMENTACION +

SEMANAS	0	5	7	8	10	13	16	23	26	29
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	0	0	0	0	0	0	0		
G	10	0*	0	14	0	43	100	100		
R	11	0*	0T	0*	0	0	0	14	100	
U	12	0*	0T	0	0	0*	0	14	71	100
P	13	0*	0T	0	0	0	14	43		
O	14	0*	0	0	0T	0*	0	0	86	86
S	15	0*	0	0	0T	0	0*	14	71	86 86
	16	0*	0	0	0T	0	0	0		
	17	0*	0	0	0	0*	0	0	83	67

+ = Los datos fueron ajustados al próximo número integral.

* = Infección o reinfección.

T = Semana de tratamiento con Triclabendazol.

9. DISCUSION

Un aspecto relevante que hace distinto la evaluación de las dos fases experimentales y que repercutió sobre los resultados y la calidad de las conclusiones, fueron:

1o. La disponibilidad de las metacercarias. Situación que impidió llevar a cabo simultáneamente la evaluación de Nitroxinil y Triclabendazol, lo cual plantea ¿los tiempos en que se llevaron a cabo las evaluaciones influyeron en la respuesta que tuvieron los ovinos al fasciolicida?.

2o. La disponibilidad de hembras de los ovinos. A pesar de saber que el sexo del animal influyó en la respuesta del Nitroxinil en la primera fase, en la evaluación del Triclabendazol no se pudieron conformar los grupos experimentales como se hubiera deseado.

El resultado fue la disminución de la calidad del diseño experimental, ya que el instrumento metodológico que se utilizó fue a través de un diseño factorial de dos factores con efectos fijos en la primera fase, en donde las conclusiones son respuesta del tratamiento (grupo experimental) y el sexo del animal.

Mientras que en la segunda fase se utilizaron efectos mixtos, siendo el tratamiento fijo y el sexo del animal variable. Las

conclusiones indican que la respuesta es dependiente del fasciolicida, pero que no existen elementos contundentes para afirmar que la respuesta es debido al sexo, de acuerdo con Montgomery (1984) y Zar (1974). Por lo que las interpretaciones debido al sexo del animal deben ser tomadas con reservas en la segunda fase. Los aspectos más relevantes son:

9.1. Recuperación de fasciolas

Los datos presentados en el Cuadro 4 muestran que dependiendo de las características de cada grupo experimental, la recuperación de fasciolas es proporcional al tratamiento. Sin embargo es importante señalar que los grupos experimentales mostraron menor número de fasciolas. En previos experimentos relacionados con la infección de metacercarias de *F. hepatica*, generalmente se colectan al menos, alrededor de un tercio del total de metacercarias dosificadas. Esta baja viabilidad de las metacercarias, no fue comprendida dado que la mayoría de quistes dosificados no tenían mas de 2 meses de edad y fueron propiamente manejados y almacenados.

El análisis indica que los grupos tratados con Triclabendazol, disminuyeron la presencia del parásito, sin ser tan eficiente como los tratados con Nitroxinil.

También es pertinente señalar que la eficacia de Triclabendazol obtenida en este estudio es inferior a aquella obtenida por otros autores en previos experimentos realizados con ovinos.

Grupos testigo infectado y re infectado. El testigo infectado (10) tuvo menos de la mitad de fasciolas recuperadas, que el testigo re infectado (17), el cual es una relación mucho menor que la obtenida de los testigos del diseño de la evaluación de Nitroxinil. Esta situación es importante, porque manifiesta que la infectividad de las metacercarias no fue similar, ya que ninguno de los grupos testigos fue tratado con ningún fasciolicida, probablemente influyó el hecho de realizar las dos fases en dos tiempos distintos.

Grupos infectados y tratados. Los datos registrados en el Cuadro 4 demostraron que los grupos 13 y 16 (tratados en la semana 5 y 8 respectivamente) presentaron el número más bajo de fasciolas recuperadas siendo de 46 y 24 respectivamente. Lo cual indica (en el caso de que el lote no sea re infectado) que la mejor opción para tratar a los borregos, es cuando los animales no son tan jóvenes.

Grupos Infectados, Tratados y Re infectados. El número de parásitos colectados en estos grupos fue muy variable siendo mayor en los grupos 11 y 12 (236 y 182), que fueron tratados en la semana 5, que los grupos 14 y 15 (97 y 119), tratados en la semana 8.

9.2. Longitud de fasciolas

Grupos testigo infectado y re infectado. Contradictoriamente se esperaba que el grupo testigo re infectado (17) tuviera tallas menores que el grupo no re infectado (10), ya que se colectaron más del doble de parásitos y los intervalos de confianza indican poca

variabilidad, en donde las fluctuaciones fueron alrededor de las tallas grandes (ver Figuras 15 y 16).

El análisis indicó que las dos modalidades de infección reportó distintas condiciones, para que se desarrollara el parásito en talla, estimándose diferencias entre los dos grupos. Las mayores discrepancias fueron entre los machos de los grupos testigos, en donde el análisis no reporta la suficiente evidencia para determinar si la eficiencia del fasciolicida esta en relación al sexo.

Grupos infectados y tratados. Cuando se registró la talla de las fasciolas de los grupos tratados (16 y 21), fue interesante notar que las fasciolas remanentes de estos grupos lograron mayor talla (20 a 22 mm), comparadas con las otras tallas de los grupos re infectados. Esta situación indica que a menor número de fasciolas presentes en el huésped, mayor talla. Sin embargo es importante mencionar que el grupo 17 fue re infectado en la semana 13 y las metacercarias no pertenecían al mismo lote.

Grupos Infectados, Tratados y Re infectados. Con relación a los grupos 12 y 14, las metacercarias dosificadas para ambos grupos pertenecieron al mismo lote, sin embargo el número de fasciolas presentes en el grupo 12 fue mayor que en el 14 siendo todas las fasciolas remanentes después del tratamiento más pequeñas en promedio que aquellas de otros grupos experimentales; estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Büscher et al

(1987), quienes mencionan que las fasciolas de grupos tratados con Triclabendazol fueron aproximadamente 5 mm más pequeñas que aquellas provenientes del grupo testigo.

Las tallas encontradas en los grupos tratados y re infectados, indican que Triclabendazol eliminó las fasciolas más grandes, sin embargo, la presencia de fasciolas más pequeñas parecen no haber sido afectadas, como se pueden constatar por el número de parásitos colectados. Esto concuerda con lo reportado por Boray et al (1983), quienes señalan que Triclabendazol es más eficaz contra el estado adulto del parásito que contra fasciolas inmaduras tempranas.

9.3. Evaluación inmunoenzimática.

Grupos testigo infectado y re infectado. La cinética de anticuerpos se presento de la siguiente manera: Los anticuerpos comenzaron a ser detectados desde la segunda semana postinfección, resultados similares fueron obtenidos por Jemli et al, (1992), en donde permite observar una respuesta humoral más intensa en los ovinos debido al efecto de las metacercarias que se mantienen altamente inmunogénicas. En el grupo 10 los anticuerpos fueron gradualmente incrementandose durante todo el experimento, permaneciendo altos hasta el final de su evaluación. En el caso del grupo 17 fue diferente considerando que los niveles de anticuerpos no fueron tan altos como en el grupo 10, pero permanecieron constantes durante la evaluación, a pesar de ser el lote re infectado.

En lo que respecta a la producción de anticuerpos expresada en porcentaje, se muestra que la actividad de los testigos infectados es similar, incrementándose en el intervalo de la semana 0 a la 5. El aspecto más relevante del grupo re infectado, es que la reinfección no causa un incremento en la producción de anticuerpos, por el contrario disminuye.

Grupos Infectados y Tratados. Los grupos 13 y 16 mostraron que aún cuando la mayoría de fasciolas fueron removidas por el antihelmíntico, los borregos no decrecieron su producción de anticuerpos, permaneciendo en el mismo nivel durante dos meses.

Grupos Re infectados. Cuando se trató contra fasciolas de 5 semanas de edad a los grupos infectados , tratados y re infectados, se observó que después del tratamiento hubo una fuerte respuesta inmune; dos semanas más tarde cuando este tratamiento fue administrado, se determinó un incremento en los niveles de anticuerpo como ocurrió en el grupo testigo. Como estos grupos fueron re infectados, el incremento de anticuerpos fue manifiesto. Cuando los animales fueron tratados contra fasciolas de 8 semanas de edad los niveles de anticuerpos, permanecieron altos y se conservaron durante los siguientes meses. Desafortunadamente debido a la conformación del diseño experimental, no fue posible continuar muestreando a los borregos para determinar el momento en que los anticuerpos declinaban a sus niveles mínimos.

Bajo estas circunstancias se puede sugerir que es mejor tratar a los ovinos entre las 10 y 12 semanas postinfección, debido a que el tratamiento podría ayudar a remover las fasciolas remanentes. Sin embargo se requiere de mayor estudio para confirmarlo.

9.4. Peso del hígado.

Los grupos tratados en la semana 5 y re infectados en las semanas 7 y 10 (grupos 11 y 12), fueron los que presentaron mayores diferencias contra casi todos los grupos experimentales, incluyendo la de los testigos.

Sin embargo, al igual que con Nitroxinil, el análisis no aporta los suficientes elementos para demostrar que el peso del hígado es afectado por la abundancia de las fasciolas o el sexo del ovino.

9.5. Coproscopia.

Los grupos controles se comportaron como era de esperarse, en cuanto a producción de huevos, liberandolos alrededor de la décima semana postinfección.

Los datos obtenidos a este respecto, indicaron que la mayoría de los ovinos de estos grupos fueron positivos a huevos de *F. hepatica* después de 14 semanas de infección, indicando que Triclabendazol removió a la mayoría de parásitos, sin embargo la mayoría de animales fueron otra vez diagnosticados como positivos entre las 10

y 15 semanas posteriores al tratamiento cuando la reinfección fue dosificada.

El único grupo en que se detectaron huevos de *F. hepatica*, fue el grupo 13, tratado en la semana 5

9.6. Eficacia antihelmíntica

Rapic et al (1988), mencionan que la comparación de análisis fecales para calcular eficacia es solo un dato aparente. Sin embargo una prueba controlada provee el método más confiable para evaluar la actividad de un antihelmíntico, siendo este el mejor indicador de eficacia fasciolicida.

Su eficacia fue demostrada contra grupos que no fueron re infectados con 68.0 y 86.6 % de eficacia para fasciolas de 5 y 8 semanas de edad. Por el contrario, se registraron eficacias no tan aceptables en los grupos tratados en la semana 5 y re infectados en la semanas 7 y 10, con 34.4 y 49.4 %. Finalmente se registró mayor eficacia sobre las fasciolas adultas de 8 semanas, que en los grupos tratados en la semana 8.

El número de parásitos colectados en estos grupos revelaron que el antihelmíntico demostró su efecto sobre las fasciolas derivadas de la primera infección.

10. CONCLUSIONES

El tratamiento con Triclabendazol ejerció mayor eficacia sobre los grupos tratados en la semana 8, influyendo en la evaluación de la infectividad de las fasciolas el lote de metacercarias.

Las fasciolas remanentes después del tratamiento fueron más grandes.

La infección seguida por reinfección después de 10 semanas no indujo protección.

El tratamiento contra *F hepatica* de 5 y 8 semanas de edad, más reinfección a las 2 y 5 semanas posteriores no produjo ninguna protección con relación a los grupos testigo infectados.

A pesar de encontrar diferencias en el peso de los hígados de los grupos experimentales, el presente estudio no proporciona evidencia concluyente para afirmar que el daño es proporcional al tamaño, número de tremátodos presentes, al sexo del ovino y a la calidad del grupo infectado o reinfectado.

El porcentaje de animales positivos al análisis coprológico, indica que en el grupo control infectado se detectaron huevos de *F hepatica* a partir de la séptima semana postinfección alcanzando el 100% de animales parasitados hasta la 13 semana, los otros grupos, aun cuando en su mayoría fueron tratados con el antihelmíntico,

demostraron estar positivos a huevos del parásito, siendo estos porcentajes de producción de huevos bajos aún en los grupos reinfectados.

El análisis del efecto de triclabendazol indica, que el sexo de los hospederos influye en la sensibilidad a la presencia de fasciola, sin embargo la evidencia no es contundente y debe ser tomada con reserva.

La respuesta inmune no se incrementa sensiblemente cuando el animal es reinfectado, por lo que la sospecha de un inmunosupresor es posible. La evaluación inmunológica no muestra una evolución paralela en la respuesta de los grupos testigos y los grupos infectados.

Cuando las fasciolas alcanzaron 8 semanas de edad la respuesta inmune permaneció igual alcanzando sus máximos niveles en la décima semana, declinando posteriormente. Posiblemente algo suceda en el huésped el cual inmunomodula todo el sistema comenzando un desarrollo, el cual no podría ser removido por tratamiento o infección. Así cuando las fasciolas están presentes, posiblemente entren en otro sistema y este es el momento cuando se determina la presencia de los primeros huevos.

Al detenerse la evolución de las fasciolas mediante el tratamiento se puede apreciar 5 semanas después la recuperación de la habilidad del sistema inmune. Esto puede ser un interés colateral, ya que el

tratamiento no solo mata a las fasciolas que deprimen la habilidad del huésped para responder; otorgando la oportunidad al huésped para recuperar la respuesta inmune, cuando su habilidad no está presente a las dos semanas postratamiento.

II. LITERATURA CITADA

Anónimo. (1986). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Ed. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Her Majesty's Stationery Office. Reference Book 418.

Arroyo, P.M.C. (1991) Incidencia de *Fasciola hepatica* en 7 rastros del Estado de México. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. Mexico, D.F.

Asanji, M.F. y Williams, M.O. (1984). The effect of sex on seasonal variation in single and double infection of cattle in Sierra Leone by *Dicrocoelium hospes* and *Fasciola gigantica*. Vet Parasitol. 15: 247-255.

Bartler, J. (1990) Efficacy of flukiver 5-inject (closantel) for treating parasitoses in sheep. Vet. Bull. 60(9): 6326.

Bautista, R., Gómez, A., Ruiz-Navarrete, A., Santillán, P. y Morilla, A. (1982). Inmunización experimental de borregos contra *Fasciola hepatica* con antígenos somático o metabólico del parásito adulto. En: Memorias de Inv. Pec. en Mex., D.F.: p 102.

Bautista, C.R. (1986). Respuesta Inmune. En: Flores, R., Quiroz, H. e Ibarra, F. (Eds.) Fasciolosis. Inst. Nal. Inv. For. Agrop. México, D.F. pp 197-234.

Bautista, C.R. y Morilla, A. (1986). Métodos de obtención de antígenos. En: Morilla, A. y Bautista, C.R. (Eds.) Manual de Inmunología. Ed. DIANA TECNICO. México. pp 37-41.

Boray, J.C. (1969). Experimental fasciolosis in Australia. In "Advances in Parasitology" (B. Dawes, ed.), Vol. 7, pp 95-212. Academic Press, London, New York.

Boray, J.C., Strong, B.M., Schellenbaum, M. y Von Orelli, M. (1981). Chemoprophylaxis of fasciolosis in sheep and cattle. Abstracts Ninth Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol. July. 13-17 Budapest. p. 171.

Boray, J.C., Crowfoot, P.D., Strong, M.B. y Allison, J.R. (1983). Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. Vet. Rec. 113: 315-317.

Boulard, C., Bouvry, M. y Argente, G. (1985). Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. Ann. Rech. Vet. 16(4): 363-368.

Bunch, S.D., Rocke, M.D. y Harrison, O.R. (1990). Statistical desig of ELISA protocols. J. Immunol. Methods 132: 247-254.

Burden, D.J., Bland, P., Hammet, N.C. y Hughes, D.L. (1983). *Fasciola hepatica*: Migration of newly encysted juveniles in resistant rats. Exp.Parasitol. 56: 277-288.

Burrows, R.B. (1978). Human and Veterinary anthelmintics (1965-1971). Research 17: 108-109.

Büscher, G., Bowen, F.L., Strong, M.B., Allison, J.R. y Richards, R.J. (1987). Extension of the prepatent period of *Fasciola hepatica* in infected animals following treatment with Triclabendazole. Vet. Rec. 120: 460-461.

Craig, T.M. y Huey, M.J. (1984). Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in naturally infected calves. Am. J. Vet. Res. 45: 1644-1645.

Davis, M., Lucas, J.M.S., Rosebaum, J. y Wright, D.E. (1966). Chemotherapy of fascioliasis II: Cyano-2-iodo-6-nitrophenol (nytroxinil) and related compounds. J. Scie. Fd. Agric., 20: 748-754.

Deelder, A.M., De Jonge, N., Boerman, O.C., Fillie, Y.E., Rothmans, G.W., Gerritse, M.J. y Schut, D.W.O.A. (1989). Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 270-274.

Dobbins, S.E. y Wellington, A.C. (1982). Comparison of the activity of some fasciolicides against the immature liver fluke in calves. Vet. Rec., 111: 177-178.

Dorchies, P., Franc, M. y Ducos de Lahitte, J. (1983). Study on activity of triclabendazole (DC1) against *Fasciola hepatica* in lambs. *Revue. Med. Vet.* 134 (4): 231-234.

Doy, T.G., Hughes, D.L. y Harness, E. (1978). Resistance of the rat to reinfection with *Fasciola hepatica* and the possible involvement of intestinal eosinophil leucocytes. *Res. Vet. Scie.* 25: 41-44.

Doy, T.G., Hughes, D.L. y Harness, E. (1980). The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted *Fasciola hepatica* in vitro. *Res. Vet. Scie.* 29: 98-101.

Doy, T.G. y Hughes, D. L. (1984). *Fasciola hepatica*: Site of Resistance to Reinfection in Cattle. *Exp. Parasitol.* 57: 274-278.

Doyle, J.J. (1971). Acquired immunity to experimental infection with *Fasciola hepatica* in cattle. *Res. Vet. Scie.* 12: 527-534.

Doyle, J.J. (1972). Studies on the development of an acquired resistance to *Fasciola hepatica* infections in cattle. PhD Thesis, Glasgow, Great Britain.

Eckert, J., Schneite, G. y Wolff, K. (1984). Fasinex (Triclabendazole) - a new fasciolicide. Institut für Parasitologie der Universität Zurich, Switzerland. *Ber. Munch. Tierärztl. Wschr.* 91: 349-356.

Encinas, R., Quiroz, H., Guerrero, C. y Ochoa, P. (1989). Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería, México, D.F. Vet. Mex. 20(4): 423-426.

Estrada, J.J., Estrada, J.A. y Kuhn, R.E. (1989). Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41: 50-55.

Foreyt, J. y Tood, A. (1978). Experimental infection of Lymnaeid snails in Wisconsin with miracidia of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 64: 1132-1134.

Foreyt, J. W. y Armstrong, A.D. (1980). Field tests of three formulations of albendazole against *Fasciola hepatica* in cattle. Vet. Med./ Small An. Clin. 75(2): 299-303.

Fortier, B., Delplace, P., Dubremetz, J.F., Ajana, F. y Vernes, A. (1987). Enzyme immunoassay for detection of antigen in acute *Plasmodium falciparum* malaria. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 596-598.

Frayha, G.J., Lawlor, W.K. y Dajani, R.M. (1971). *Echinococcus granulosis* in albino mice: Effect of host sex and sex hormones on the growth of hydatid cysts. Exp. Parasitol. 29: 255-262.

Garvey, S.J., Cremer, E.N. y Sussdorf, H.D. (1977). Estimation of protein. En: Benjamin, W.A. (Ed). Methods in Immunology. 3a.ed. London, pp 71-92.

Gibson, T.E. (1975) Veterinary anthelmintic Medications. Technical communications. 3a. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.

Harfenist, M. (1973). Diamphenetide - A new fasciolicide active against immature parasites. Pestic. Sci. 4: 871-882.

Haroun, E.M., Hammond, J.A. y Sewel, M.M.H. (1980). Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following implantation of adult flukes contained in difusion chambers. Res. Vet. Scie. 29: 310-314.

Haroun, E.M. y Hyllyer, G.V. (1986). Resistance to Fascioliasis. A. review. Vet. Parasit. 20: 63-93.

Hernández, F.J.A. (1976). Incidencia de *Fasciola* sp y su repercusión económica por decomiso de hígados afectados en el rastro municipal de Toluca, Edo. de México. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot.. Universidad Nacional Autónoma de México.

Horchner, F., Greick, H. y Flasshoff, F.G. (1976). Zur diagnostik der rinderfasciolose. Berl. Munch. Tieraztl. Wschr. 89: 296-300

Horner, M.R. (1970). Economics of parasitic disease. J. Parasitol. 56: 427.

Hughes, D.L., Harness, E. y Doy, T.G. (1981). The different stage of *Fasciola hepatica* capable of inducing immunity and the susceptibility of various stages to immunological attack in the sensitised rat. Res. Vet. Scie. 30: 93-98.

Huijun, Z., Zhenghou, T., Reddy, M.V., Harinath, B.C. y Piessens, W.F. (1987). Parasite antigens in sera and urine of patients with bancroftian and brugian filariasis detected by sandwich ELISA with monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36: 554-560.

Ibarra, F., Quiróz, H., Perez, H., Vera, Y. y Tello, M. (1987). Determinación de la extensión el efecto de Triclabendazol, Rafoxanide, Nitroxinil y Meniclofolan en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica* Tec. Pec. Mex. 25(3): 404-408.

Ibarra, F., García, C., Vera, Y., Escudero, J. y Vázquez, C. (1989a). Acción aditiva de dos fasciolicidas en ovinos criollos. Vet. Mex. 20: 203-208.

Ibarra, F., Vera, Y., Quiróz, H., Olazarán, S., Pérez, H. y Casas, E. (1989b). Efecto del posible sinergismo de un inmunógeno de *Fasciola hepatica* y triclabendazol en ovinos. Vet. Mex. 20: 197-202.

Ibarra, F. y Vera, Y. (1991a). Comparación del efecto extensivo de cinco fasciolícidas en bovinos en clima cálido. Vet. Mex. 22: 159-163.

Ibarra, F., Vera, Y. y Franco, L. (1991b). Evaluación del posible efecto sinérgico de dos fasciolícidas en ovinos. Vet. Mex. XXII(4): 437-440.

Jarramendy, R., Pedroso, M. y Mesa, J.J. (1985). Detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in experimentally infected calves. Revta. Salud Anim. 7(2): 131-140.

Jarrett, E.E.E. y Bazin. (1974). Elevation of total sero-IgE in rats following helminth parasite infection. Nature. 25: 613-614.

Jarrett, E.E.E. y Miller, A.R.F. (1982). Production and activities of IgE in helminth infection. Prog. Allerg. 31: 178-233.

Jemli, M.H., Escoula, L., Magnaval, J.F. and Dorchies, P. (1992). Exploration de la réponse immunitaire chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. Revue. Med. Vet. 143(4): 355-360.

Katzin, A.M., Alexandre, C.O.P., Kimura, E.A., Ríó, V.J. y Peres, J. (1988). Antigenuria in malaria. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J. Suppl. 1(83): 208.

Keesey, J. (1987). Protease Inhibitors. En Biochemica Information. 1a ed. Published by Boehringer Mannheim Biochemicals. Indianapolis. Printed in USA. pp 106-123.

Knight, R.A. (1983). Age resistance of sheep to *Fasciola hepatica*. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 50: 108-111.

Larry, C., Stewart, G.L., Kramar, G.W. y Stanfield, J.A. (1981). The effect of host sex on enteric response to infection with *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 67: 917-922.

Lindenschmidt, E.G. (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of soluble *Toxoplasma gondii* antigen in acute-phase toxoplasmosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 488-492.

Londoner, M.V., Rosen, G., Sintov, A. y Spira, D.T. (1987). The feasibility of a dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* antigens and antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36: 240-245.

Maes, L., Lauwers, H., Deckers, W. y Vanparijs, O. (1988). Flukicidal action of closantel against immature and mature *Fasciola hepatica* in experimentally infected rats and sheep. Res. Vet. Scie. 44: 229-232.

Maes, L., Vanparijs, O., Lauwers, H. y Deckers, W. (1990). Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against

Fasciola hepatica in experimentally infected sheep. Vet. Rec. 127(18): 450-452.

Malone, J.B., Ramsey, R.T y Layacano, A.F. (1984). Efficacy of clorsulon for treatment of mature naturally acquired and 8-week-old experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. Am. J. Vet. Res. 45(5): 851-854.

Milián, S.F. (1986). Pronóstico médico y económico. En: Flores, C.R., Quiroz, R.H. e Ibarra, V.F. (Eds.) Fasciolosis. Inst. Nal. Invest. Forest. y Agropec. México, D.F. 310-334.

Mankau, J.A. y Hamilton, R. (1972). The effect of sex and sex hormones on the infection of rats by *Trichinella spiralis*. Can. J. Zool. 50: 597-602.

Montgomery, C.D. (1984). Design and analysis of experiments. 2a.ed. Edit. Wiley & Sons. New York. pp 537.

Morzik, H., Jones, H., Friedman, J., Schwarts, K.G., Schardt, R.A. Patchett, A.A., Half, D.R., Yakstis, J.J., Risk, F.R., Ostlind, D.A., Buttler, R.N., Cuckler, A.C. y Campbell, W.C. (1969). A new agent for the treatment of liver fluke infection (fascioliasis). *Experientia*, 25: 883-889.

Njau, B.C., Kasali, O.B., Scholtens, R.G. y Akalework, N. (1989). The influence of watering practices on the transmission of *Fasciola*

among sheep in the Ethiopian highlands. Vet. Res. Commun. 13: 67-74.

Quiróz, H., Ibarra, F. y Vera, Y. (1988). Eficacia del triclabendazol contra formas inmaduras de *Fasciola hepatica* y la ganancia de peso en bovinos. Vet. Mex. 19: 29-33.

Quiróz, R.H. (1984). Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. 1a. ed. Ed. Limusa, México, D.F.

Rapic, D., Dzakula, N., Sakar, D. y Richards, R.J. (1988). Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxinil, and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. Vet. Rec., 122: 59-62.

Reddington, J.J., Stewart, G.L., Kramar, G.W. y Kramar, M.A. (1981). The effect of host sex and hormones on *Trichinella spiralis* in the mouse. J. Parasitol. 67: 545-548.

Reddington, J.J., Wesleid, R. y Wescott, B.R. (1986). The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. Vet. Parasitol. 19: 145-150.

Richards, R.J., Bowen, F.L., Essenwein, F., Steiger, R.F. y Buscher, G. (1990). The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. Vet. Rec. 126: 213-216.

Ross, J.G. (1966). Experimental infections of cattle with *Fasciola hepatica*. Nature (London). 212: 1464-1465.

Ross, J.G. (1967). Studies of immunity to *Fasciola hepatica*. Acquired immunity in cattle, sheep and rabbits following natural infection and vaccine procedures. J. Helmitol. 41: 393-399.

Santiago, N. y Hillyer, G.V. (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep with *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 74(5): 810-818.

Sánchez, E., Ibarra, F., Pérez, J. y Casas, E. (1988). Evaluación de la ganancia de peso en ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica* y tratados con triclabendazol. Vet. Mex. 19: 145-149.

Sexton, J.L., Milner, A.R. y Campell, N.J. (1991). *Fasciola hepatica*: immunoprecipitation analysis of biosynthetically labelled antigens using sera from infected sheep. Para. Immunol. 13: 105-108.

Sher, A., Smithers, S.R., Mackenzie, P. y Broomfield, K. (1977). *Schistosoma mansoni* immunoglobulins involved in passive immunization of laboratory mice. Expl. Parasit. 41: 160-166.

Sinclair, B.K. (1971). Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in sheep. Br. Vet. J. 127(3): 125-135.

Sinclair, I.J. y Wassall, D.A. (1988). Sero-Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. Vet. Parasitol. 27: 283-290.

Smithers, S.R. y Terry, R.J. (1969). Immunity in Schistosomiasis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 160: 826-840.

Smithers, S.R. y Doenhoff, M.J. (1982). Schistosomiasis. In immunology of Parasite Infections. Eds. Cohen, S. and Warren, K.S. pp. 527-607. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Solomon, G.B. (1969). Host hormones and parasitic infection. Int. Rev. Trop. Med. 3: 101-158.

Soulsby, E.J.L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7a. ed. Ed. Interamericana. México, D.F. p. 45.

Spulek, V., Moosbrugger, G.A. y Meyer, K. (1958). Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum der mit Leberegel behafteten Rinder. Schweiz. Arch. Tierheilk. 100: 610-615.

Sumano, L.H. y Ocampo, C.L. (1989). Farmacología Veterinaria. 2a. ed. Ed. McGraw-Hill, Mexico.

Turner, K., Armour, J. y Richards, R.J. (1984). Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. Vet. Rec. 114: 41-42.

Urquhart, G.M. (1955). Experimental fascioliasis in the rabbit. PhD Thesis. University of Glasgow.

Van Knapen, F., Panggabean, S.O. y Van Leusden, J. (1986). Evaluation of laboratory diagnosis of Toxoplasmosis by means of an ELISA triple test. *Antonie van Leeuwenhoek*. 52: 5-13.

Van Tiggele, L.J. (1978). Serological diagnosis of fascioliasis. Vet. Parasitol. 1: 239-248.

Vera, Y. (1985). Evaluación de diferentes dietas alimenticias para cultivo en condiciones de laboratorio de *Lymnaea bulimoides*, *Lymnaea cubensis* y *Lymnaea humilis*. Tesis de Licenciatura. ENEP - Iztacala. UNAM. México, D.F.

Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. WHO. 53: 55-65.

Weil, G.J., Jain, J.C., Santhanan, S., Malhotra, A., Kumar, H., Sethumadhavan, K.V.P., Liftis, F. y Ghosh, T.K. (1987). A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. J. Infect. Dis. 156: 350-355.

Wellington, A.C. (1978). Nitroxylnil: Anthelmintic activity in cattle following subcutaneous injection. J. South African Vet. Assoc. 49(2): 125-126.

Williams, M.O. (1969). First record of *Dicrocoeliasis* in cattle in Sierra Leone. Bull. Epizoot. Dis. Afr. 17: 433-434.

Wolff, K., Eckert, J., Schneider, G. y Lutz, H. (1982). Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep and goats. Vet. Parasit. 13: 145-150.

Wycroff, J.H., y Bradley, (1986). An optimized enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative diagnosis of bovine fascioliasis. J. Parasit, 72: 439-444.

Zar, J.H. (1974). Biostatistical Analysis. Ed. Prentice Hall, INC. Englewood, Cliffs, N.J. pp 620.