

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCION DE ANTIGENOS DE Fasciola
hepatica EN HECES Y SUERO DE
OVINOS POR MEDIO DE ELISA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
P A R A S I T O L O G I A

PRESENTA:

MVZ MA. DEL CONSUELO ALMAZAN GARCIA

ASESORES:

DR. HECTOR QUIROZ ROMERO
MC GUILLERMINA AVILA RAMIREZ
DR. FROYLAN IBARRA VELARDE
DR. PEDRO OCHOA GALVAN



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

Esta tesis es el resultado del trabajo de investigación de la autora, en ella se da reconocimiento a las fuentes de información consultadas.

La autora da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



MA. DEL CONSUELO ALMAZÁN GARCÍA

DEDICATORIA

A DIOS: Por guiar mis pasos y permitirme lograr esta meta en mi vida

A lo mas valioso que tengo: **MIS PADRES**
Porque a ellos debo lo que soy....

A MIS HERMANOS:

Heriberto, Juan, Nel, José, Benis, Martin, Claudia, Fabi y Adrianita
Por que han sido mi principal fuente de inspiración para superarme, aunque eso significó estar separados por largo tiempo y porque el amor que nos han inculcado nuestros padres nos mantenga unidos siempre.

A MI TÍA:

Profra. Ernestina García Zamora
Por el apoyo que siempre nos ha brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Quiroz por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por sus enseñanzas, sabios consejos, confianza, y ejemplo de trabajo.

A la MC Guillermina Avila Ramírez por el tiempo brindado a la asesoría de este trabajo, por su ejemplo de superación y porque en ella conocí a una persona excepcional.

A los miembros del h. jurado por la revisión y valiosos comentarios hechos a esta tesis.

Al Dr. Ramón Bautista por sus aportaciones y sugerencias que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

Al personal del departamento de Parasitología de la FMVZ por el apoyo y amistad que me brindaron durante mi estancia en la UNAM, especialmente a la Dra Ma. Teresa Quintero por sus palabras de apoyo en estos momentos difíciles de mi vida.

Al Dr. José Luis Dávalos jefe del Departamento de Producción Animal de la FMVZ-UNAM por proporcionar los ovinos utilizados en el estudio preliminar.

Al MVZ Eduardo Sánchez Samaniego y MVZ Ernesto Dávalos por el apoyo brindado en la toma de muestras de los ovinos del estudio preliminar.

Al MVZ Antonio Ortiz y MVZ Javier Gutiérrez por el apoyo y facilidades brindadas durante la infección experimental de los ovinos en el C.E.P.I.E.R.

Al MC Antonio Figueroa Castillo y Espiridión Ramos por su compañía y ayuda en la toma de muestras.

A mi maestro Miguel A. Salazar Licea por motivarme en el estudio de la parasitología.

Al MC Sergio Garza Quiroga, director de la FMVZ-UAT y al MVZ Fernando Arizpe García, Secretario General de la UAT por el apoyo que me otorgaron desde mis estudios de licenciatura.

Al Dr. Javier Flores Covarrubias, Secretario de la División de Estudios de Posgrado de la FMVZ-UNAM, porque siempre me brindó una sonrisa y trato amable.

Al personal del Lab. de la Dra. Ana Flisser, Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Fac. de Medicina de la UNAM por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

A la Biol. Laura Aguilar, al QFB Pablo Maravilla y al QBP Antonio Martínez por el apoyo y amistad brindados durante el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros de maestría: Mary, Toño y Javier porque compartimos un ideal: *Parasitología*.

A Abraham Raúl González por su compañía y valiosa colaboración en la terminación de este trabajo.

A La Dra. Cristina Guerrero por su ayuda desinteresada durante los últimos meses.

Un Agradecimiento especial lo merece el Dr. Alfonso López Mayagoitia por su apoyo, amistad y sobre todo por creer en mi... MIL GRACIAS.

A la agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (CIDA) y a la Dirección General de Intercambio Académico UAT-UNAM porque gracias a la beca otorgada por ellos me fue posible realizar estudios de posgrado.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT-IN218996 DGAPA-UNAM

Al personal del Lab. de la Dra. Ana Flisser, Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Fac. de Medicina de la UNAM por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

A la Biol. Laura Aguilar, al QFB Pablo Maravilla y al QBP Antonio Martínez por el apoyo y amistad brindados durante el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros de maestría: Mary, Toño y Javier porque compartimos un ideal: *Parasitología*.

A Abraham Raúl González por su compañía y valiosa colaboración en la terminación de este trabajo.

A La Dra. Cristina Guerrero por su ayuda desinteresada durante los últimos meses.

Un Agradecimiento especial lo merece el Dr. Alfonso López Mayagoitia por su apoyo, amistad y sobre todo por creer en mi... MIL GRACIAS.

A la agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (CIDA) y a la Dirección General de Intercambio Académico UAT-UNAM porque gracias a la beca otorgada por ellos me fue posible realizar estudios de posgrado.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT-IN218996 DGAPA-UNAM

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
1.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.2. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE <i>F. hepatica</i>	4
1.3. INMUNOLOGÍA.....	7
1.3.1 Antígenos de <i>F. hepatica</i>	10
1.3.2 Respuesta inmune del huésped a la infección por <i>F. hepatica</i>	12
1.4. DIAGNÓSTICO.....	15
1.5. ANTECEDENTES.....	17
1.5.1 Detección de antígenos circulantes en suero	17
1.5.2 Detección de antígenos en heces (coproantígenos).....	18
1.6. JUSTIFICACIÓN.....	22
1.7. HIPÓTESIS.....	24
1.8. OBJETIVOS.....	24
2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
2.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	25
2.1.1. Localización del estudio.....	25
2.1.2. Diseño experimental.....	25
2.1.3. Toma de muestras.....	26
2.2. ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>F. hepatica</i> EN HECES Y SUERO DE OVINOS.....	26
2.2.1. Elaboración de antígeno de excreción y secreción de <i>F. hepatica</i>	27
2.2.2. Obtención de otros antígenos parasitarios.....	27

2.2.3. Obtención de suero policlonal anti- <i>F. hepatica</i>	28
2.2.4. ELISA para la determinación de anticuerpos anti- <i>F. hepatica</i> en suero de conejo hiperinmune	28
2.2.5. Obtención de IgG de conejo anti- <i>F. hepatica</i>	29
2.2.6. Preparación del conjugado de IgG anti- <i>F. hepatica</i>	30
2.2.7. Procesamiento de muestras de suero para el ELISA.....	31
2.2.8. Procesamiento de muestras de heces para el ELISA.....	31
2.2.9. Estandarización del ELISA para detección de antígenos de <i>F.</i> <i>hepatica</i> en suero de ovino.....	32
2.2.10. Determinación del criterio de positividad del ELISA.....	33
2.2.11. Capacidad del ELISA para detectar concentraciones conocidas de antígeno de E/S de <i>F. hepatica</i> en SSAF suero y sobrenadante de heces.....	33
2.2.12. Detección de antígenos heterólogos de parásitos con el sistema de anticuerpos policlonales anti- <i>F. hepatica</i>	34
2.2.13. Evaluación del número de parásitos a la necropsia y su relación con la presencia de antígenos en suero y heces.....	34
2.2.14. Sensibilidad y especificidad del ELISA para detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en ovinos infectados experimentalmente.....	34
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
3.-RESULTADOS	37
3.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	37
3.2. ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ELISA PARA DETEC- CIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>F. hepatica</i> EN HECES Y SUERO DE OVINOS.....	37
3.2.1. Capacidad del ELISA para detectar concentraciones cono- cidas de antígeno de E/S de <i>F. hepatica</i> en SSAF, suero y sobre- nadante de heces.....	38
3.2.2. Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en los tres grupos de ovinos infectados experimentalmente.....	38

3.2.3. Valores de absorbancia obtenidos en suero, sobrenadante de heces, número de huevos y carga parasitaria en el grupo 1.....	39
3.2.4. Valores de absorbancia obtenidos en suero, sobrenadante de heces, número de huevos y carga parasitaria en el grupo 2.....	40
3.2.5. Valores de absorbancia obtenidos en suero, sobrenadante de heces, número de huevos y carga parasitaria en el grupo 3.....	41
3.2.6. Captura de antígenos heterólogos de parásitos por medio del ELISA para detección de antígenos de <i>F. hepatica</i>	42
3.2.7. Evaluación de la carga parasitaria y su relación con la detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA.....	43
3.2.8. Sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en suero y heces de ovinos infectados experimentalmente.....	43
4.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	45
5.- LITERATURA CITADA.....	56
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Promedio de huevos de <i>F. hepatica</i> por gramo de heces en ovinos infectados experimentalmente.....	67
Cuadro 2: Número de parásitos adultos recuperados a la necropsia de ovinos infectados experimentalmente.....	68
Cuadro 3: Valores de absorbancia obtenidos al probar diferentes concentraciones de anticuerpos y antígeno en el ELISA.....	69
Cuadro 4: Titulación del antígeno de E/S de <i>F. hepatica</i> en SSAF, suero y sobrenadante de heces.....	71
Cuadro 5: Valores de absorbancia obtenidos en los sueros del grupo 1 infectado con 50 metacercarias y en el grupo testigo.....	75
Cuadro 6: Valores de absorbancia obtenidos en sobrenadante de heces del grupo 1 infectado con 50 metacercarias y en el grupo testigo.....	77
Cuadro 7: Valores de absorbancia obtenidos en los sueros del grupo 2 infectado con 100 metacercarias y en el grupo testigo.....	79
Cuadro 8: Valores de absorbancia obtenidos en sobrenadante de heces del grupo 2 infectado con 100 metacercarias y en el grupo testigo.....	81
Cuadro 9: Valores de absorbancia obtenidos en los sueros del grupo 3 infectado con 200 metacercarias y en el grupo testigo.....	83
Cuadro 10: Valores de absorbancia obtenidos en sobrenadante de heces del grupo 3 infectado con 200 metacercarias y en el grupo testigo.....	85
Cuadro 11: Captura de antígenos heterólogos en el ELISA para detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en suero y heces.....	87
Cuadro 12: Relación entre el número de parásitos recuperados a la necropsia y la absorbancia de antígenos en suero de ovinos infectados experimentalmente.....	90
Cuadro 13: Relación entre el número de parásitos recuperados a la necropsia con la absorbancia de antígenos en el sobrenadante de ovinos infectados experimentalmente	91

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Valores de absorbancia obtenidos al probar diferentes concentraciones de antígeno y anticuerpos en el ELISA.....	70
Figura 2: Curvas de titulación del antígeno de E/S de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA.....	72
Figura 3: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en suero en los tres grupos de ovinos infectados y en el grupo testigo..	73
Figura 4: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en heces en los tres grupos de ovinos infectados y en el grupo testigo..	74
Figura 5: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA en suero de ovinos del grupo 1.....	76
Figura 6: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA en heces de ovinos del grupo 1.....	78
Figura 7: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA en suero de ovinos del grupo 2.....	80
Figura 8: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA en heces de ovinos del grupo 2.....	82
Figura 9: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA en suero de ovinos del grupo 3.....	84
Figura 10: Dinámica de detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> por medio del ELISA en heces de ovinos del grupo 3.....	86
Figura 11: Evaluación del ELISA para detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en suero de ovinos.....	88
Figura 12: Evaluación del ELISA para detección de antígenos de <i>F. hepatica</i> en heces de ovinos.....	89

RESUMEN

ALMAZÁN GARCÍA MA. DEL CONSUELO. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica* EN HECES Y SUERO DE OVINOS POR MEDIO DE ELISA. (Asesores: Dr Hector Quiroz Romero, MC Guillermina Avila Ramírez, Dr Froylan Ibarra Velarde y Dr Pedro Ochoa Galván).

Se estandarizó un ELISA de doble anticuerpo de captura para la detección de antígenos de *F. hepatica* en suero y heces de ovinos infectados experimentalmente con 50, 100 y 200 metacercarias obtenidas de moluscos *Lymnaea cubensis* cultivados en laboratorio. Se tomaron muestras de suero y heces semanalmente a partir del momento de la infección, las cuales fueron probadas en el ELISA mediante el sistema de doble anticuerpo policlonal acoplado a peroxidasa; como anticuerpo de captura se utilizaron 25 µg/ml de IgG obtenida de suero de conejo inmunizado con antígenos de E/S de *F. hepatica*, y como anticuerpo de revelado 30 µg/ml de la misma IgG, conjugada a peroxidasa. El ensayo mostró un límite de resolución de 12, 190 y 90 ng/ml de antígeno en SSAF, suero y sobrenadante de heces respectivamente. El ELISA detectó antígenos del parásito a partir de la segunda spi en suero ($p<0.05$) y a partir de la cuarta spi en heces ($p<0.05$) mientras que los huevos se detectaron por el método de sedimentación a partir de la octava spi. La correlación entre absorbancia de antígenos y carga parasitaria en suero fue de 0.77 ($p<0.0001$) y en sobrenadante de heces de 0.76 ($p<0.0001$). La sensibilidad del ensayo fue de 86 % en suero y en heces de 96.6%, la especificidad tanto en suero como en heces fue de 100 %. No se encontró reacción cruzada con extractos de *Paramphistomum*, *Moniezia expansa*, *M. benedeni*, *Haemoncus contortus*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Macracanthorhynchus hirudinaceus* y adulto y larva de *Taenia solium*; se concluye que el ELISA empleado ofrece una alternativa en el diagnóstico de *F. hepatica* durante y después del periodo prepatente de la infección en ovinos.

Palabras clave: antígenos, *F. hepatica*, ELISA, ovinos.

SUMMARY

ALMAZÁN GARCÍA MA. DEL CONSUELO. ELISA DETECTION OF *F. hepatica* ANTIGENS IN FAECES AND SERA OF SHEEP. (Supervisors: Dr Hector Quiroz Romero, MC Guillermina Avila Ramírez, Dr Froylan Ibarra Velarde and Dr Pedro Ochoa Galván).

A double capture antibody for ELISA in sera and faeces for the detection of *F. hepatica* was standardized in sheep experimentally infected with 50, 100 and 200 metacercariae obtained from *Lymnaea cubensis* snails reared under laboratory conditions. Sera and faeces samples were obtained weekly from the beginning of the infection and both tested by ELISA through a double polyclonal antibody joined to peroxidase. As capture antibody 25 µg/ml of IgG were used, obtained from immunized rabbit serum with *F. hepatica* E/S antigen, using as a second antibody 30 µg/ml of the same IgG, but joined to peroxidase. The assay showed a resolution limit of 12, 190 and 90 ng/ml of antigen in PBS, sera and supernatant of faeces respectively, the ELISA test detected parasite antigens from the 2nd week postinfection (wpi) in serum ($p < 0.05$) and 4th wpi in faeces ($p < 0.05$), while egg shedding were detected by the sedimentation method from the 8th wpi. Correlation between antigen absorbance and parasitic burden in serum was of 0.77 ($p < 0.0001$) and in supernatant of faeces of 0.76 ($p < 0.0001$). Sensitivity at the test was of 86% in serum and 96.6% in faeces. Specificity either from serum or faeces was of 100%. No cross reaction were observed when *Paramphistomum*, *Moniezia expansa*, *M. benedeni*, *Haemoncus contortus*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Macracanthorhynchus hirudinaceus*, adult and larvae of *Taenia solium* extracts were tested. It was concluded that the test employed offers a new diagnostic alternative for *F. hepatica* diagnosis during and after the prepatente period of infection in sheep.

Key words: antigens, *F. hepatica*, ELISA, sheep.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

La Fasciolosis (Kassai *et al.* 1988) es una enfermedad producida por el trematodo *Fasciola hepatica*, parásito que se localiza en el parénquima hepático en estadio inmaduro y en conductos biliares en estadio adulto (Dunn, 1983; Quiroz, 1984; Soulsby, 1987). Afecta a bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, gatos, humano y animales silvestres pero principalmente a bovinos y ovinos (Soulsby, 1987). El ciclo de vida de este helminto es indirecto y los huéspedes intermediarios son caracoles acuáticos y anfibios de los géneros *Lymnaea*, *Fossaria* y *Pseudosuccinea*. La clasificación taxonómica de este parásito de acuerdo con Quiroz (1984) y Soulsby (1987), es la siguiente:

PHYLUM: Platyhelminthes

CLASE: Trematoda

SUBCLASE: Digenea

FAMILIA: Fasciolidae

GENERO: *Fasciola*

ESPECIE: *F. hepatica*

Dentro del género *Fasciola* se encuentran dos especies: *F. hepatica* y *F. gigantica*, la primera tiene un distribución mundial y la segunda se presenta en África, varios países de Asia y Hawai (Acha y Szyfres, 1986). La fasciolosis debida a *F. hepatica* causa pérdidas económicas por decomiso de hígados, infecciones bacterianas secundarias, interferencia en la fertilidad, reducción de la producción de leche y carne y gastos sobre las medidas de control y mortalidad (Sinclair, 1962 y Quiroz, 1995).

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) es el más importante de los trematodos que parasitan a los animales domésticos. Se le reconoce como patógeno desde hace más de dos mil años y es el parásito que más se ha estudiado en medicina veterinaria (Dunn, 1983).

1.2. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE *F. hepatica*

Los trematodos de la familia Fasciolidae son largos, aplanados, tienen forma foliácea, el extremo anterior es alargado, en forma de cono y en la punta poseen una ventosa, la cutícula de estos parásitos está cubierta de espinas, las especies que pertenecen a esta familia parasitan a los mamíferos y existen tres géneros que son de interés veterinario: *Fasciola*, *Fascioloides* y *Fasciolopsis* (Dunn, 1983). *F. hepatica* no tiene especificidad de huésped, pudiéndose encontrar en diferentes especies de mamíferos. En los huéspedes infrecuentes como el caballo y el hombre se puede encontrar en pulmón y bajo la piel (Soulsby, 1987), también se han encontrado fasciolas adultas en la cavidad peritoneal, útero de bovinos y tejido subcutáneo como formas erráticas (Quiroz, 1984). La vida del parásito en conductos biliares es de uno a seis años (Quiroz, 1984), otros autores mencionan que las fasciolas pueden durar hasta 11 años parasitando a ovinos (Melhorn y Piekarski, 1993).

El adulto de *F. hepatica* es un gusano plano sin segmentos ni cavidad celómica, mide de 2 a 3.5 cm de longitud por 1- 1.5 cm de ancho, presenta una porción anterior en la que se encuentra una ventosa oral, se comunica con el esófago muscular y se continúa con el intestino formado por ciegos intestinales que se ramifican hacia los lados, después de la porción cefálica el parásito se ensancha y a ese nivel se encuentra la ventosa ventral, con la cual se fija a la pared de los conductos biliares (Dunn, 1983 y Soulsby, 1987), abajo de la ventosa ventral se abre el poro genital (Quiroz, 1984).

F. hepatica es un parásito hermafrodita que produce 20,000 huevos diariamente, los huevos son operculados y miden 130 a 150 μm de longitud por 60 a 90 μm de ancho, en el extremo más estrecho los huevos presentan un opérculo, sin tinción en exámenes en fresco tienen un color que varía del amarillo brillante al café (De Haro *et al.* 1995), aproximadamente en nueve días se desarrolla el miracidio dentro del huevo, este mide 150 por 40 μm y es ciliado, posee una mancha ocular en forma de X, glándulas y espolón cefálico (Quiroz, 1984).

El miracidio abandona el huevo para infectar al huésped intermediario, esto lo hace en las primeras 24 horas (Dunn, 1983). Los huéspedes intermediarios de *F. hepatica* son: *Pseudosuccinea columella*, *Lymnaea diaphana*, *Fossaria bulimoides*, *F. cubensis* y *F. viatrix* entre otros (Perera, 1995). El tiempo de desarrollo del miracidio depende de la temperatura, a 26°C eclosionan en nueve días, pero a 10°C no se desarrollan, aunque permanecen viables durante un largo periodo pudiendo continuar su desarrollo cuando las condiciones le sean favorables (Quiroz, 1984).

Al penetrar en el molusco, el miracidio muda a una segunda fase conocida como esporocisto el cual alcanza una longitud aproximada de 1 mm (Soulsby, 1987) el cual es un saco de células germinativas que no contiene órganos y cuya única función es la de reproducirse (Dunn, 1983). Cada esporocisto forma cinco a ocho redias que salen de él y se desarrollan hasta medir una longitud de uno a tres mm de longitud (Soulsby, 1987). Las redias poseen boca, una faringe muscular y un par de apéndices, tienen también esferas germinales en su interior y de ellas se desarrolla el segundo estadio que recibe el nombre de cercaria (Levine, 1973 y Soulsby, 1987).

Desde el punto de vista morfológico la cercaria es un trematodo joven (Dunn, 1983), tienen un cuerpo circular con una depresión en el extremo posterior, miden 250 a 350 μm de longitud, poseen una ventosa anterior alrededor de la boca, una faringe muscular, dos ciegos intestinales, una ventosa central o acetábulo y una cola que mide 500 a 100 μm de largo (Levine, 1973), en las partes laterales del cuerpo de la cercaria se encuentran las glándulas citógenas que son oscuras y granulares (Soulsby, 1987). La cercaria abandona el hepatopáncreas que es el lugar donde crece en el molusco y viaja por la corriente sanguínea hasta la cutícula, a través de la cual pasa al agua del medio (Dunn, 1983), el abandono del huésped intermediario por la cercaria ocurre a las cuatro a siete semanas postinfección (spi) (Levine, 1973 y Soulsby, 1987). La cantidad de cercarias originadas de un solo miracidio puede llegar a ser de 600 (Quiroz, 1984).

A las dos horas de salir del caracol, las metacercarias se desprenden de su cola, las glándulas citógenas secretan una sustancia que forma la pared del quiste, posteriormente se enquistan en la vegetación (Levine, 1973). Los quistes miden 0.2 mm de diámetro, desde este momento las metacercarias son infectantes (Soulsby, 1987).

La infección de los animales ocurre al ingerir alimento (forraje) o agua contaminados con metacercarias (Quiroz, 1984). Debido a la acción del jugo gástrico, el pH y la temperatura del tracto digestivo la pared quística de las metacercarias se disuelve (Bautista, 1993), el trematodo joven es liberado, en este momento mide 250 μm , penetra a través de la pared del intestino delgado alcanzando la cavidad peritoneal en el transcurso de dos a 28 horas (Quiroz, 1984). Posteriormente, penetran en el hígado perforando la cápsula de Glisson y de cuatro a seis días llegan al tejido hepático por el que emigran durante seis a ocho semanas para asentarse en los conductos biliares donde alcanzan la

madurez sexual (Melhorn y Piekarski, 1993). Las fasciolas jóvenes se nutren con sangre y tejido hepático mientras que las adultas lo hacen con sangre y tejido epitelial, en ovinos el período prepatente de *F. hepatica* es de ocho semanas, mientras que en bovinos es de 10 semanas (Quiroz, 1984).

1.3. INMUNOLOGÍA

La reacción inmunológica que provoca *F. hepatica* en el huésped depende de la especie afectada; la resistencia natural o innata contra este parásito se ha clasificado como: alta, en los cerdos, moderada en los bovinos, caballos, ratas y humanos y baja en ovinos y ratones (Bautista, 1989).

La respuesta inmune contra *F. hepatica* ocurre contra fasciolas juveniles en la cavidad peritoneal y contra fasciolas adultas en el hígado, los eventos que suceden son los siguientes: las fasciolas juveniles, al emigrar en la cavidad peritoneal de animales inmunes, son cubiertas por anticuerpos opsonizantes derivados de las células B. Por otro lado, los eosinófilos maduran en la médula ósea por efecto del factor activador de las colonias, secretado por los linfocitos T sensibilizados contra el parásito, la liberación del factor quimiotáctico de eosinófilos de anafilaxia e histamina de las células cebadas y basófilos, provocan la movilización de los eosinófilos al lugar donde se encuentran las fasciolas, posteriormente, estos por medio de sus receptores para el fragmento Fc de los anticuerpos, se adhieren a los parásitos y descargan su contenido enzimático sobre el tegumento, destruyéndolos y evitando que lleguen al hígado (Bautista, 1989).

Hughes, *et al.* (1981) mencionan que durante la migración de *F. hepatica* a través de la cavidad peritoneal y parénquima hepático se desarrolla una respuesta inmunológica contra antígenos de excreción y secreción (E/S) y que la

concentración de anticuerpos comienza a declinar una vez que las fasciolas se establecen en los conductos biliares.

En bovinos, al desenquistarse las metacercarias, penetran al intestino delgado y migran por la cavidad peritoneal hacia el hígado, en esta fase el parásito estimula por primera vez al sistema inmune, de esta manera es posible detectar inmunoglobulina (Ig) M a las dos a tres spi (Bautista, 1989). En ovinos, los anticuerpos anti-*Fasciola* pueden detectarse desde las dos a tres spi alcanzando títulos máximos a las cinco spi, los cuales comienzan a disminuir entre las seis y 16 spi, los anticuerpos de clase IgG1 tienen predominancia sobre los IgG2 e IgM (Bautista, 1989). En conejos se ha observado que los anticuerpos contra *F. hepatica* se detectan a partir de la tercera a cuarta spi, aunque los valores de absorbancia para ser considerados positivos aparecen a partir de la quinta a sexta spi, lo que está relacionado con el número de parásitos presentes en el hígado (Santiago, 1993).

Hughes, *et al.* (1981) realizaron estudios sobre anticuerpos contra las secreciones intestinales de *F. hepatica*, y antígenos del tegumento de parásitos juveniles, encontrando una máxima concentración de IgG e IgA entre las cuatro a seis spi. Los niveles de IgG comenzaron a declinar lentamente después de seis spi, mientras que la IgA alcanzó el pico mas alto hasta las ocho spi, y la IgG contra antígenos del tegumento apareció en el suero después de la quinta spi y mostró un título bajo comparado con la IgA contra antígenos del tegumento de juveniles, por otro lado, la respuesta de IgG contra antígenos del tegumento del estadio adulto es detectada en el suero de bovinos y ovinos a las seis spi, en estos últimos disminuye el título de anticuerpos a las 12 semanas, mientras que en los bovinos permanece constante hasta las 20 semanas.

Hanna y Hillyer (1984) en estudios con inmunofluorescencia encontraron que en infecciones por *F. hepatica* los anticuerpos están dirigidos contra antígenos presentes en el tegumento, intestino y sistema excretor del parásito, por otro lado también mencionan que de los anticuerpos producidos por ovinos contra secreciones de fasciolas, predominan los de clase IgG2 y que en becerros después de una infección aparecen células productoras de IgA en el hígado, pero después de una segunda infección, las células productoras de IgG1 predominan tanto en hígado como en nódulos linfáticos hepáticos.

Bautista (1989) menciona que en bovinos, entre la octava y doceava semana aumentan los títulos de anticuerpos IgG1 y aparecen células cebadas en los conductos biliares, en esta fase, el sistema inmune del huésped actúa nuevamente contra los parásitos y éstos se mueven a nuevos lugares en los conductos biliares o son expelidos.

Osman *et al.* (1995) compararon la presencia de IgM e IgG en infecciones crónicas por fasciolosis en humanos concluyendo que la IgG permanece por mayor tiempo en la circulación que la IgM, también evaluaron un ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando antígenos de E/S de *F. hepatica*, en este trabajo se pudo demostrar que la IgM se encuentra en niveles detectables durante la fase aguda de la enfermedad, mientras que la IgG se encuentra en el suero de animales con infecciones crónicas.

Se ha demostrado que la IgE y la respuesta anafiláctica en ovinos son necesarios para aumentar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos contra *F. hepatica*, además los ovinos pueden desarrollar una alta respuesta eosinofílica (Chauvin *et al.* 1995).

1.3.1. Antígenos de *F. hepatica*

Los antígenos de *F. hepatica* se dividen en somáticos o estructurales, que por lo general son extractos crudos de todo el parásito y antígenos metabólicos o productos de E/S que son el resultado de la actividad fisiológica cuando se les mantiene *in vitro* (Espino *et al.* 1988 y Bautista, 1989). Al respecto Osman *et al.* (1995) menciona que los antígenos de E/S son un complejo del contenido intestinal de los trematodos junto con el glicocáliz.

Santiago *et al.* (1986) menciona que los antígenos de E/S se difunden fácilmente hacia la circulación del huésped particularmente cuando los parásitos aun son inmaduros y se encuentran migrando en el parénquima hepático, por otro lado, como consecuencia de la obstrucción de conductos biliares pequeños, la bilis y antígenos de E/S, son vertidos al torrente circulatorio.

Se han realizado estudios con el objeto de identificar los antígenos mas relevantes para su utilización en el diagnóstico, fraccionando los componentes de antígenos somáticos y de E/S de distintos estadios de *F. hepatica*, haciéndolos reaccionar con sueros de animales infectados con el parásito, por medio de inmunoprecipitación, marcando los antígenos radiactivamente (Sexton *et al.* 1991). De esta manera es posible separar los antígenos de acuerdo a su tamaño en geles de poliacrilamida y transferirlos a papel de nitrocelulosa. Santiago y Hillyer (1988) demostraron que los componentes somáticos con un peso molecular de 30 a 38 kDa son reconocidos por sueros tanto de bovinos como de ovinos y los componentes de 56, 64 y 69 kDa fueron reconocidos únicamente por los de bovinos, concluyendo que las diferencias en los patrones de reconocimiento antigénico podrían estar relacionadas, con la resistencia que estas especies presentan. Al respecto, Gorman *et al.* 1994, encontraron fracciones

proteicas con pesos moleculares que van desde 16 a 58 kDa en sueros de ovinos infectados naturalmente con *F. hepatica*.

Santiago *et al.* (1986) al realizar estudios sobre antígenos de *F. hepatica* en conejos por medio de Inmunolectrotransferencia e inmunoprecipitación, detectaron un antígeno proteico de 62 kDa a las cinco spi y tres antígenos de 38, 40 y 44 kDa predominaron a las nueve spi, lo cual hace suponer la presencia de múltiples antígenos con potencial diagnóstico, al respecto Chauvin *et al.* (1995) encontraron que los antígenos proteicos en fasciolosis ovina oscilan entre nueve a 156 kDa, y que las proteínas de 20, 24, 51 y 69 kDa son específicas para *F. hepatica*.

Rivera *et al.* (1988) mencionan que tanto en la fasciolosis aguda como en la crónica puede identificarse un polipéptido predominante de 25 a 30 kDa, el cual es reconocido por conejos, bovinos y ovinos, también mencionan que en la infección temprana se detectan fracciones de alto peso molecular que van de los 150 a 160 kDa, estos antígenos ofrecen una mayor sensibilidad en el diagnóstico. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Santiago y Hillyer (1988) quienes mencionan que en ovinos esta banda se detecta a las seis spi.

Otro estudio realizado por Ruiz-Navarrete *et al.* (1993) se menciona que existe un reconocimiento específico de un componente de 55 kDa por los sueros de ovinos desde la segunda spi, el cual puede ser útil en la detección temprana del parásito. Por su parte, García *et al.* (1996) detectó un componente de 57 kDa a partir de la segunda spi en sueros de ovinos con fasciolosis experimental.

En cuanto a la presencia de antígenos comunes en varios parásitos, Hillyer y Sagramoso (1980) al infectar ratones con *F. hepatica* y *Schistosoma mansoni*

demonstraron la existencia de antígenos comunes entre estos dos parásitos; como consecuencia de ello, se observó reacción cruzada entre anticuerpos producidos contra los dos parásitos, lo cual interfiere con el serodiagnóstico. Al respecto, Biguet *et al.* (1965) y Capron *et al.* (1968), citados por Bautista (1989) encontraron que un extracto de *Fasciola* comparte antígenos con *Dicrocoelium dendriticum*, *Taenia saginata*, *Paragonimus westermani*, *Chlonorchis sinensis*, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *Trichinella spiralis* y *Ascaris lumbricoides*. Del total de los 25 diferentes antígenos del extracto, seis correspondían a antígenos de bovino, y cuatro a antígenos del caracol *Lymnaea truncatula*.

1.3.2. Respuesta inmune del huésped a la infección por *F. hepatica*

La respuesta a fasciolosis es diferente en ovinos y bovinos, esto puede asociarse con el hecho de que en bovinos hay una calcificación de conductos biliares, lo que no sucede en ovinos (Hughes *et al.* 1981). En este contexto, Sandeman y Howell (1981) mencionan que existe una variación considerable entre animales en su respuesta inmune a la infección por *F. hepatica*.

No hay evidencia que indique una sensibilización primaria en ovinos con *F. hepatica* y que esto estimule algún grado de resistencia a la reinfección, en términos de reducción en el número de parásitos recuperados; sin embargo, otras manifestaciones como crecimiento retardado del parásito, disminución del tamaño, reducción de la producción de huevos por los adultos, la anemia en el huésped y el elevado título de anticuerpos puede ser visto como efecto de una sensibilización primaria (Haroun y Hillyer, 1986).

Sinclair (1962) al infectar ovinos con 150 metacercarias de *F. hepatica* durante cuatro ocasiones, concluyó que en efecto, los ovinos no adquieren

resistencia a la infección. Al respecto, Boray (1969) al infectar ovinos con 1000 metacercarias de *F. hepatica*, desparasitarlos y reinfectarlos con 4000 metacercarias, no encontró una diferencia marcada en el número de fasciolas recuperadas en comparación con el grupo testigo; sin embargo, Sinclair (1962) menciona que no hay resistencia a la reinfección pero la producción de huevos por el trematodo se ve reducida cuando se infectan ovinos durante varias ocasiones.

En otro estudio realizado por Boray (1967) se menciona que la fibrosis hepática en ovinos infectados en repetidas ocasiones actúa como una barrera mecánica, la cual no reduce el número y tamaño de los parásitos, pero si disminuye la migración de los mismos en la reinfección. Al respecto Sinclair (1970) comprobó que en los ovinos infectados por segunda vez con *F. hepatica*, los parásitos juveniles emigran mas rápidamente a los conductos biliares debido a la reacción local que producen. Este mismo autor (1971) al estudiar el efecto protector de fasciolas inmaduras, comparó dos grupos de ovinos, uno infectado y otro tratado al término de ocho spi, los animales infectados mostraron un retraso marcado en el desarrollo de los parásitos a las ocho spi, así como una actividad fibroblástica junto con infiltración linfocitaria mayor en comparación con los animales del grupo testigo.

Un estudio realizado sobre el efecto primario de sensibilización en ovinos con repetidas dosis de infección con 20 metacercarias semanalmente durante cinco semanas, seguido de un tratamiento con albendazol y posteriormente una infección con 500 metacercarias, se encontró que los parásitos más pequeños fueron recuperados de animales sensibilizados, pero no hubo reducción en el número de parásitos en comparación con el grupo testigo (Knight, 1980).

Se ha asumido que el lumen de los conductos biliares es un sitio inmunológicamente protegido, en el cual las fasciolas pueden crecer y desarrollarse sexualmente sin que interfiera la respuesta del huésped (Hughes *et al.* 1981).

Por otro lado Sandeman y Howell (1981) mencionan que la respuesta de anticuerpos durante el período postinfección se suprime, y que esta puede deberse a un factor inmunosupresor realizado por los parásitos adultos o alternativamente a las fasciolas inmaduras o adultos de la infección primaria que pueden secretar antígenos y causar una falla en el nivel de anticuerpos, esto también puede deberse a la formación de complejos inmunes que suprimen la respuesta de células B ó T.

También se ha podido demostrar que en ovinos infectados con *F. hepatica* durante la infección primaria se induce una respuesta inmune la cual se manifiesta por hiperplasia de los nódulos linfáticos, esta respuesta fue claramente demostrada por la producción de anticuerpos anti-*F. hepatica* a las dos spi (Chauvin *et al.* 1995); así mismo se menciona la importancia de los eosinófilos durante la infección, la cual se relaciona con el incremento de IgE, además se observó que la mayor cantidad de eosinófilos concuerda con la fase de migración de las formas juveniles, mientras que un segundo aumento ocurre cuando los parásitos se establecen en los conductos biliares

1.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de *F. hepatica* se realiza a través del examen coproparasitológico (ECP), utilizando generalmente la técnica de sedimentación de Benedeck, sin embargo, en la fase aguda y prepatente de la enfermedad, la infección no puede ser confirmada debido a la ausencia de huevos en las heces, este método tiene una baja sensibilidad y en ocasiones requiere de numerosos análisis seriados (Castro *et al.* 1994). Además, se estima que la técnica de sedimentación no permite detectar más del 50% de bovinos infectados cuando ésta se realiza una sola vez, y que la mayoría de las infecciones ligeras no son detectadas por dicha técnica (Sánchez, 1991).

El diagnóstico en bovinos solo puede realizarse después de las ocho a 10 spi por ECP (Hillyer, 1993). El daño al hígado y la enfermedad aguda son causados por formas inmaduras en migración, se ha sugerido que estas pueden ser detectadas mediante la presencia de enzimas como sorbitol deshidrogenasa (SDH), glutamato deshidrogenasa (GLDH), (Sandeman y Howell, 1981) y gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) en el suero (Faría *et al.* 1989 y Quiroz y Faría, 1991), sin embargo estas enzimas solo son indicadoras de daño hepático en general, por lo que su detección no es indicativa de infección por el parásito y su uso es limitado (Qureshi, 1995).

Como alternativa en el diagnóstico de fasciolosis, se ha motivado el desarrollo de técnicas inmunológicas y en especial las que permiten la detección de antígenos de E/S, por ser los primeros en evocar la respuesta inmune (Langley y Hillyer, 1989, Espino, *et al.* 1990, Castro *et al.* 1994, Espino y Finlay, 1994 y Rodríguez y Hillyer, 1995). El inmunodiagnóstico también permite detectar la presencia de anticuerpos utilizando antígenos del parásito completo

homogeneizado con diferentes grados de purificación, estadios larvarios, huevos y productos de E/S (Quiroz, 1984).

Por lo anteriormente señalado el diagnóstico de la fasciolosis utilizando métodos inmunológicos provee la posibilidad de una mayor sensibilidad para la identificación de animales infectados en todos los estadios de la infección, no solo por el hallazgo de huevos en las heces (El-Bali *et al.* 1992)

Para el inmunodiagnóstico de *F. hepatica* en diferentes especies animales se han empleado distintas pruebas, como la intradermoreacción (Enríquez, 1971, Benex, 1973, Quiroz *et al.* 1973 y Lebrija *et al.* 1981), inmunoensayo en capa delgada (Morilla *et al.* 1979, Gómez *et al.* 1981, Arriaga *et al.* 1983, y Arriaga *et al.* 1989), hemaglutinación pasiva (Arriaga *et al.* 1983, Arriaga *et al.* 1989, Leviex y Venien, 1992), inmunoprecipitación (Hillyer *et al.* 1985), doble difusión en gel (Blancou *et al.* 1971, Arriaga *et al.* 1983 Jemly *et al.* 1987), ELISA (Hillyer, 1985; Boulard *et al.* 1985, Espino y Finlay 1994, Aguilera *et al.* 1995, Fernández *et al.* 1995 e Ibarra *et al.* 1995) e inmunoelectrotransferencia (Santiago y Hillyer, 1986, Santiago *et al.* 1986, Rivera *et al.* 1988, Ruiz-Navarrete *et al.* 1993 y Gorman *et al.* 1994).

En las pruebas de diagnóstico de fasciolosis se han utilizado extractos crudos del parásito como componentes de E/S, los cuales proporcionan mayor especificidad que los antígenos somáticos (Hillyer y Soler, 1991).

El ELISA indirecto se ha utilizado ampliamente en México en los últimos años, por medio de esta técnica se pueden detectar anticuerpos anti-*F. hepatica* desde la segunda spi (Bautista, 1991, Fernández *et al.* 1995 e Ibarra *et al.* 1995); sin embargo, algunos investigadores afirman que los niveles de anticuerpos

disminuyen lentamente después del tratamiento químico, y que los anticuerpos pueden detectarse en animales expuestos al parásito sin llegar a contraer la infección (Espino *et al.* 1990, El-Bali *et al.* 1992, Espino y Finlay, 1994 y Castro *et al.* 1994), por lo que la detección de anticuerpos es menos óptima para la predicción de enfermedad.

1.5 ANTECEDENTES

1.5.1 Detección de antígenos circulantes en suero.

Raymond y Hillyer (1989) sugieren que la detección de antígenos circulantes en suero de animales con fasciolosis resulta ventajoso sobre la detección de anticuerpos, ya que la antigenemia es indicativa de infección reciente y activa. Estos autores desarrollaron un ELISA para la detección de antígenos circulantes de *F. hepatica* en ratas infectadas experimentalmente, utilizando suero hiperinmune contra antígenos de E/S como anticuerpos de captura, la prueba se comparó con un ELISA para detección de anticuerpos para determinar la utilidad en el diagnóstico. En este estudio se detectó la infección a la 1a spi y la máxima detección de antígenos circulantes se manifestó a la 3a spi, se demostró que la detección de antígenos circulantes tiene una ventaja sobre la determinación de anticuerpos debido a que la antigenemia asegura al diagnóstico por ser indicativa de infección activa.

En un estudio realizado por Espino *et al.* (1990) se detectaron antígenos circulantes en humanos con fasciolosis, usando un anticuerpo monoclonal contra antígenos circulantes de E/S de *F. hepatica* como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal acoplado a peroxidasa para identificar los antígenos circulantes. Se estudiaron 28 sueros de pacientes infectados con *F. hepatica* y 80 con otras parasitosis. los sueros fasciolosos mostraron una concentración

detectable de antígeno mayor a 10 ng/ml, ninguno de los 80 sueros mostró reacción positiva sugiriendo la ausencia de reacción cruzada con *Entamoeba histolytica*, *A. lumbricoides*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *G. lamblia*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa* y *Mansonella pestans*.

Rodríguez, y Hillyer (1995) realizaron un estudio con el objeto determinar el tiempo de aparición de antígenos de E/S en suero de ovinos por medio de ELISA, al infectar un grupo de ovinos con 400 metacercarias de *F. hepatica* y otro grupo con 5000 cercarias de *S. mansoni*, este mismo grupo se inoculó con 400 metacercarias de *F. hepatica*, a las 10 spi de la primera infección con *S. mansoni*. El ensayo detectó antígenos en todos los suero de ovinos del primer grupo, mientras que en el segundo con doble infección mostró reacción positiva a antígenos de E/S solo después de las diez semanas cuando se infectaron con *F. hepatica*. También se realizó un ELISA rápido para detección de anticuerpos, en el primer grupo, los anticuerpos se detectaron a la segunda spi y en el segundo grupo, los anticuerpos aparecieron a la quinta y sexta spi con *S. mansoni*, concluyendo la presencia de reacción cruzada entre anticuerpos de *F. hepatica* y *S. mansoni*, no siendo así en los antígenos de los dos parásitos.

1.5.2. Detección de antígenos en heces (coproantígenos)

La posibilidad de que los antígenos parasitarios sean detectados en las heces, se sugiere en el trabajo de Stibbs *et al.* (1988), quienes reportan por primera vez el uso de la técnica de ELISA para la detección de coproantígenos de *G. lamblia* en humanos, obteniendo 54 resultados positivos en 59 muestras de pacientes con síntomas clínicos de giardiosis, mostrando la prueba una sensibilidad del 91.5%.

La detección de antígenos en heces o coproantígenos del huésped, se ha logrado con éxito en infecciones gastrointestinales por virus, bacterias y protozoarios (Green, 1986). Vinayak *et al.* (1991) al examinar muestras de 24 pacientes con signos clínicos de giardiasis confirmada, mediante la prueba de dot-ELISA con anticuerpos mono-específicos detectaron 22 de los 24 casos (91.7%).

Recientemente se ha reportado la detección de coproantígenos en infecciones naturales por cestodos en humanos y en infecciones experimentales de roedores y perros (Allan *et al.* 1990; Allan y Craig, 1992). En un estudio sobre inmunodiagnóstico de teniosis por coproantígenos realizado por Allan *et al.* (1990) al infectar cricetos con metacestodos de *T. solium*, se encontró un incremento de antígenos en heces a partir del quinto dpi, no se encontró reacción cruzada con heces de ratones infectados con *Hymenolepis diminuta*, *H. citelli*, *H. microstoma*, *Necator americanus*, *Strongyloides ratti* o *Nematospiroides dubius*.

Otro estudio en teniosis por *Taenia hydatigena* en perros infectados experimentalmente, mediante un ELISA, los coproantígenos se comenzaron a detectar en todos los perros infectados entre los 18 a 45 días de infección, mientras que la excreción de huevos y proglótidos se observó de los 57 a 71 días. (Desplazes *et al.* 1990)

Avila (1992) al reproducir la teniosis por *T. solium* en el modelo del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) demostró que los antígenos pueden detectarse en el período prepatente de la infección por medio de un ELISA de doble anticuerpo policlonal, ya que estos estuvieron presentes desde la segunda spi, y desaparecieron cuando se eliminaron los parásitos por efecto del tratamiento cestocida; el ensayo tuvo una sensibilidad y especificidad del 100% en el modelo experimental y al probar el ensayo en casos humanos no se detectaron falsos

positivos en pacientes con infecciones intestinales por protozoarios y cestodos como *H. diminuta*, tampoco hubo reacción cruzada con extractos de *Echinococcus granulosus*, *H. nana*, *F. hepatica*, *Wellcomeia evoluta*, *Echinorhyncus gadi* y *Monoecocestus americana*.

Allan, *et al.* (1992) realizaron un estudio para detectar antígenos de *Taenia spp* y *E. granulosus* en heces mediante un ELISA utilizando suero hiperinmune de conejo contra antígeno somático de cestodos adultos. El primer ensayo, un antisuero contra extracto crudo de *T. pisiformis* fue empleado en el transcurso de la infección con *T. pisiformis* en perros, el antígeno estuvo presente en las heces antes del período prepatente y los niveles de antígeno fueron independientes del número de huevos. Un segundo ensayo consistió en diagnosticar la teniosis humana por medio de anticuerpos contra *T. solium* en dos áreas endémicas de Guatemala y China, éste tuvo una especificidad del 96%, además se detectó teniosis en individuos que no habían sido diagnosticados por la presencia de huevos o proglotidos, los mismos autores en un tercer ensayo realizado para el diagnóstico de *E. granulosus*, encontraron un 87.5% y 96.5% de especificidad en muestras de perros infectados en forma natural y experimentalmente con *E. granulosus* o *Taenia spp* respectivamente.

Allan y Craig (1994) al trabajar con ratas infectadas experimentalmente con *H. diminuta* detectaron antígenos en heces antes del período patente por ELISA; los antígenos fueron independientes de la cantidad de parásitos y la cantidad de huevos no contribuyó significativamente en los valores de absorbancia de antígenos.

El desarrollo de pruebas para la detección de antígenos de nematodos en heces también está teniendo un auge importante. Ellis *et al.* (1993) desarrollaron

un ELISA de captura para identificar antígenos de *Haemonchus contortus* en heces de ovinos infectados naturalmente con cargas parasitarias moderadas. También se desarrolló una prueba para detectar antígenos de *Strongyloides ratti* en heces de ratas por medio de un ELISA de captura con anticuerpos policlonales contra antígeno somático de adultos y larvas, detectando la infección en el período prepatente; la prueba mostró muy baja reacción cruzada con *Necator americanus* y *Siphasia muris* (Nageswaran *et al.* 1994).

Espino y Finlay (1994) desarrollaron un ELISA para la detección de antígenos de E/S de *F. hepatica* en muestras de heces de humanos utilizando un anticuerpo monoclonal (ES78). 13 de 14 pacientes con evidencia de fasciolosis tuvieron una concentración detectable de antígenos mayor de 15 η g/ml, no se encontró reacción cruzada con *S. mansoni*, *E. histolytica*, *G. lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *N. americanus*, *T. saginata* y *S. stercoralis*. La sensibilidad fue de 92.8%, también se encontró una correlación significativa ($r = 0.92$) entre concentración de antígenos y número de huevos.

Castro *et al.* (1994) reportan la detección de coproantígenos para evaluar la infección activa por *F. hepatica* en bovinos utilizando el ELISA de captura con reactivos comerciales (Fasciding) encontrando una sensibilidad del 95.3% y una especificidad del 99%, aunque estos valores varían de acuerdo a la cantidad de huevos presentes en las heces.

Espino *et al.* (1997) al trabajar con ratas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, por medio de un ELISA de captura con un anticuerpo monoclonal (ES78) detectaron coproantígenos a las cuatro spi en el 45% de los animales infectados, a la siguiente semana los coproantígenos se detectaron en el 85% y a las seis spi se detectaron en el 100% de las ratas infectadas.

1.6. JUSTIFICACIÓN

La fasciolosis es una parasitosis que en México no se ha controlado adecuadamente, por el contrario la prevalencia presenta una tendencia al aumento y por lo mismo las pérdidas económicas son cuantiosas (Castellanos *et al.* 1992). Las pérdidas directas se traducen en decomiso de hígados y éstas se han evaluado por estudios en rastros (Encinas *et al.* 1989), pero es difícil cuantificar las pérdidas por concepto de infecciones bacterianas secundarias, disminución en la producción de leche y carne, disminución en la fertilidad, gastos sobre las medidas de control y en algunos casos la muerte (Quiroz, 1995).

En México no se han desarrollado pruebas diagnósticas que detecten antígenos de *F. hepatica* tanto en heces como en suero. Las técnicas utilizadas en la actualidad se basan en la detección de huevos del parásito y de anticuerpos mediante pruebas inmunológicas indirectas; el empleo de técnicas de inmunodiagnóstico para la detección de antígenos tanto en heces como en suero permite detectar la presencia del parásito en el huésped, lo cual no es posible por medio de la detección de anticuerpos, pues su presencia solo es indicadora de contacto con el parásito, y no es indicativo de una infección activa, debido a ello, los datos sobre estudios epidemiológicos basados en la detección de anticuerpos realizados hasta la fecha pueden ser erróneos debido a que la enfermedad se detecta después del período prepatente y puede haber anticuerpos que den reacción cruzada con otras parasitosis. Por otro lado, la importancia de contar con métodos de diagnóstico mas sensibles y específicos se hace necesario debido a la alta prevalencia de *F. hepatica* en México, sobre todo en ganado bovino y ovino.

En el presente estudio se plantea la utilización de un ELISA de doble anticuerpo de captura, mediante un anticuerpo policlonal dirigido contra antígenos de E/S de *F. hepatica* para la detección de antígenos en heces y suero de animales infectados y su posible utilización como una prueba de diagnóstico con ventajas sobre los métodos convencionales como el realizar el diagnóstico en una mayor cantidad de muestras en menor tiempo, durante el periodo prepatente y con la seguridad de que se trata de infección presente y activa. Esto hará posible la realización de estudios epidemiológicos y el establecimiento de programas de control quimioterapéutico en animales de zonas donde la enfermedad es endémica.

1.7. HIPÓTESIS

- Los antígenos de *F. hepatica* en heces y suero de ovinos se detectan durante el período prepatente de la infección por medio del ELISA.

- La detección de antígenos de *F. hepatica* en heces y en suero mediante el ELISA es altamente sensible y específica.

- Existe una relación directa entre la absorbancia de antígenos en heces y suero con la cantidad de fasciolas presentes en el hígado de ovinos infectados experimentalmente.

1.8. OBJETIVOS

- Determinar el tiempo de aparición de antígenos de *F. hepatica* en heces y suero de ovinos

- Evaluar la sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de antígenos de *F. hepatica* tanto en las heces como en el suero de ovinos infectados experimentalmente.

- Determinar la relación entre la absorbancia de antígenos en las heces y el suero, con la cantidad de fasciolas presentes en el hígado de ovinos infectados experimentalmente.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL.

2.1.1. Localización del estudio

El trabajo de campo se realizó en el Centro de Enseñanza, Producción, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER) ubicado en Topilejo, D.F., la fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) en conjunto con el departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

2.1.2. Diseño Experimental

Se utilizaron 20 ovinos, de cruce pelibuey con rambouillet, de 3 meses de edad con un peso promedio de 30 kg, y al inicio de la infección los animales fueron negativos a la presencia de huevos de nematodos gastrointestinales y *F. hepatica*. Los animales se asignaron aleatoriamente en cuatro grupos; el grupo uno se infectó con 50 metacercarias por vía oral en cápsulas de gelatina, de acuerdo con Gupta y Yadav (1993), el grupo dos con 100 metacercarias y el grupo tres con 200 metacercarias, el último grupo no fue infectado y fungió como testigo. Durante el transcurso de la infección los animales permanecieron en corrales con piso de cemento, el alimento consistió en forraje seco y diariamente se les proporcionó un suplemento alimenticio, el agua se les proporcionó *ad libitum*. Las metacercarias utilizadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el Biol. Lauro Trejo, jefe del Departamento de Parasitología del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SAGAR, ubicado en Jiutepec, Morelos, dichas metacercarias provenían de moluscos *Lymnaea cubensis*, infectados con miracidios de *F. hepatica* de origen bovino, las

metacercarias tenían un 70.% de viabilidad y un mes de edad al momento de la infección.

2.1.3. Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre y heces a partir del día de la infección (día 0), posteriormente los muestreos se realizaron cada siete días, hasta cumplir tres meses, siendo en total 13 muestreos. Las muestras de heces fueron tomadas directamente del recto utilizando bolsas de polietileno, las muestras de sangre fueron tomadas mediante tubos vacutainer sin anticoagulante de la vena yugular, las muestras fueron identificadas y transportadas en refrigeración al laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UNAM, donde fueron procesadas. El suero se separó por centrifugación y se guardó en viales a -20°C, las heces se homogeneizaron en igual cantidad de solución salina amortiguada con fosfatos adicionada con tween 20 al 0.3% (SSAF-T) y albúmina sérica bovina (ASB) al 0.1% (Sigma, Chem. Co.), se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 10000g durante 25 minutos a 4°C, y fue almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

2.2. ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO INMUNO - ENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *F hepatica* EN HECES Y SUERO DE OVINOS.

La estandarización del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* se realizó de acuerdo al método descrito por Engvall y Perlmann (1972). La detección de antígenos del parásito se hizo por medio del ensayo de captura con doble anticuerpo policlonal.

2.2.1 Elaboración de antígeno de excreción y secreción de *F. hepatica*

Se preparó antígeno a partir de excreciones y secreciones de parásitos adultos completos (Espino *et al.* 1988), obtenidos de hígados de bovinos decomisados en el rastro municipal de Toluca, México. Los parásitos vivos se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.2 cinco veces con el objeto de remover restos de sangre y bilis, posteriormente se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 y 10,000 UI ml⁻¹ de penicilina durante 24 horas a 37°C, se colectó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry *et al.* (1951) y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

2.2.2 Obtención de otros antígenos parasitarios

Con el objeto de elaborar antígenos de parásitos que pudieran reaccionar con el ELISA para *F. hepatica* se obtuvieron *Haemonchus contortus*, del abomaso de ovinos del Centro de Extensión e Investigación en Ganadería Tropical ubicado en Martínez de la Torre, Ver., *Paramphistomum* spp del rúmen de bovinos sacrificados en el rastro municipal de Martínez de la Torre, Ver. y *Moniezia expansa* y *M. benedeni* del intestino de bovinos y ovinos sacrificados en los rastros de Los Reyes La Paz y Cd. Nezahualcóyotl, Edo. de México. También se obtuvieron antígenos de *Taenia solium* de los estadios y del metacestodo, *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum* y *Macracanthorhynchus hirudinaceus*. Los parásitos se lavaron en SSAF y se transportaron en refrigeración al laboratorio de parasitología de la FMVZ de la UNAM. Todos estos parásitos se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso.

2.2.3. Obtención de suero policlonal anti-*F. hepatica*

Con el objeto de obtener anticuerpos anti-*F. hepatica*, se inmunizaron dos conejos de raza Nueva Zelanda de 1.5 kg de peso con antígeno de E/S de *F. hepatica*, de acuerdo con Espino *et al.* (1988).

El día 0 se aplicó un ml de antígeno de E/S de *F. hepatica* emulsionado con igual cantidad de Adyuvante completo de Freund por vía subcutánea; antes de la inmunización se obtuvo una muestra de sangre del pabellón auricular para obtener suero, que se guardó a -20°C para utilizarlo como testigo negativo en el ELISA para detección de anticuerpos anti-*F. hepatica*. El día 15, se aplicó un ml de antígeno emulsionado con un ml de adyuvante incompleto de Freund por vía subcutánea. Se realizaron otras tres inmunizaciones, los días 30, 45 y 60, con antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund. Se realizó un ELISA para detección de anticuerpos anti *F. hepatica* con las diferentes muestras de suero del conejo. Los títulos de anticuerpos se mostraron altos al día 60, y se aplicó una última inmunización, el día 75 se realizó el sangrado por punción cardiaca, se obtuvo la mayor cantidad de sangre posible y el suero se obtuvo por centrifugación y se almacenó a -20 C hasta el momento de su uso.

2.2.4. ELISA para la determinación de anticuerpos anti-*F. hepatica* en suero de conejo hiperinmune

Para comprobar la presencia de anticuerpos específicos contra *F. hepatica* en el suero hiperinmune, se realizó un ELISA indirecto según el procedimiento descrito por Engvall y Perlmann (1972), con las muestras de suero obtenidas los días 0, 30, 60 y 75 posinmunización.

1.- Acoplamiento del antígeno a un soporte sólido: Se usaron placas para microtitulación de fondo plano (Inmulon, Dynatech Labs. Inc.). Se colocaron 100

μ l/pozo de antígeno de *F. hepatica* a una concentración de 1 μ g/ml en amortiguador de carbonatos, pH 9.6, y se incubó durante 12 horas a 4°C.

2.- Lavado de la placa: Se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con 200 μ l de SSAF-T al 0.3% por pozo.

3.- Adición del primer anticuerpo: Se prepararon diluciones 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 y 1:12800 de las muestras de suero de conejo hiperinmune, se adicionaron 100 μ l/pozo de cada una de las diluciones por duplicado y se incubaron durante una hora a 37°C.

4.- Se repitió el paso 2.

5.- Adición del segundo anticuerpo: Se utilizó conjugado anti-IgG de conejo producido en cabra (Sigma, Chem. Co.), acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1:500 en SSAF-T, se adicionaron 100 μ l/pozo y se incubó durante una hora a 37°C.

6.- Se repitió el paso 2.

7.- Adición del sustrato: se utilizó p-nitrofenilfosfato disódico (Sigma, Chem. Co.), se disolvió una tableta de 10 mg del sustrato en 2.5 ml de agua y se aforó a 10 ml con amortiguador de dietanolamina al 10%, pH 9.8, se adicionaron 100 μ l/pozo y se incubó durante 15 minutos a 37°C.

8.- Los valores de absorbancia se determinaron en un lector (Bio-Rad) a 405 nm.

2.2.5. Obtención de IgG de conejo anti-*F. hepatica*

La precipitación de proteínas del suero se realizó mediante la adición lenta de sulfato de amonio al 50% en igual cantidad de suero, se centrifugó a 2000 g/15 minutos a 4°C (Sorvall RT 6000 B), se decantó el sobrenadante y se volvió a resuspender con solución salina durante cuatro ocasiones, finalmente el precipitado se dializó contra solución salina, se hicieron tres cambios de solución, finalmente el contenido se guardó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

La purificación de la IgG del suero hiperinmune se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de Proteína A sefarosa CL 4B (Sigma, Chem. Co.) de 1.5 x 2.5 cm, antes de correr la columna ésta se lavó y equilibró con SSAF, se adicionó 1 ml de suero de conejo y se dejó absorber la IgG en la columna durante 12 horas a 4°C, la IgG se eluyó con glicina 0.1 M pH 2.8. Se colectaron fracciones de 1.0 ml, la densidad óptica de las fracciones se leyó en un espectrofotómetro (Beckman DU-65) a 280 nm para determinar la presencia de proteínas. Se graficó la densidad óptica contra el número de fracción y se unieron las fracciones correspondientes al pico de elución que contenía el material unido a la columna. La IgG se dializó durante 12 horas contra SSAF a 4°C. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry *et al.* (1951) y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

2.2.6. Preparación del conjugado de IgG anti *F. hepatica*

Se ajustó la concentración de proteína de la IgG a 5.2 mg/ml, posteriormente se dializó contra bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.1 M pH 8.0 durante 12 horas a 4°C. Por cada miligramo de IgG se adicionaron 200 µl de una solución de peroxidasa (Sigma, Chem. Co.). La mezcla se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante cuatro horas en agitación lenta. La IgG se dializó contra SSAF y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso. La actividad de la IgG se probó titulando la IgG de la siguiente manera: como primer anticuerpo se adsorbió IgG anti- *F. hepatica* a diferentes concentraciones (10, 15, 20, 25 y 30 µg/ml) en placas de microtitulación de 96 pozos (Nunc, maxishop) diluída en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.6, Se adicionaron cantidades conocidas de antígeno de E/S de *F. hepatica* y como anticuerpo de revelado se utilizó la IgG anti- *F. hepatica* acoplada a peroxidasa en concentraciones de 10, 15, 20, 25 y 30 µg/ml, Entre cada paso se realizaron tres lavados de cinco minutos y se hicieron incubaciones de una hora a 37°C, finalmente se adicionó el sustrato 0 -

fenilendiamina (Sigma Chem. Co.) en amortiguador de citratos (0.1 M) pH 4.5, conteniendo 4 μ l de peróxido de hidrógeno al 30% (Merck). Los valores de absorbancia se obtuvieron en un lector de ELISA (Bio rad) 492 nm, dichos valores se graficaron contra la concentración de antígeno.

2.2.7. Procesamiento de las muestras de suero para el ELISA.

En relación al procesamiento de las muestras de suero, se utilizaron diferentes diluciones en SSAF-Tween 20 al 0.3% hasta llegar a la dilución 1:10, 1:5, 1:3 y suero concentrado, se observó que los valores de absorbancia eran más altos utilizando suero concentrado, por lo que se optó por trabajar las muestras utilizando 100 μ l de suero por pozo por duplicado.

2.2.8. Procesamiento de las muestras de heces para el ELISA.

Con el objeto de solubilizar los antígenos de *F. hepatica* presentes en las heces, se realizó inicialmente un ensayo en heces de ovinos no infectados (grupo testigo) para determinar los parámetros óptimos de dilución y centrifugación. Las muestras se solubilizaron en SSAF adicionado con Tween-20 al 0.3% y ASB al 0.1% a una proporción 1:1, se les adicionó antígeno de E/S de *F. hepatica* partiendo de una concentración inicial de 100 μ g/ml y se hicieron diluciones seriadas. Las heces se homogeneizaron manualmente y se centrifugaron a 10,000 g/30 minutos a 4°C, (Sorvall RT 6000 B), se tomó el sobrenadante en viales y se guardó a -20°C, hasta su utilización. Antes de probar las muestras en el ELISA se realizó una segunda centrifugación a 10,000 g/5 minutos a temperatura ambiente, (eppendorf 5415 C) posteriormente las muestras de heces se procesaron bajo estas condiciones.

2.2.9. Estandarización del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* en suero de ovinos.

1.- Acoplamiento del primer anticuerpo a un soporte sólido: Se usaron placas para microtitulación de 96 pozos de fondo plano (Nunc, maxisorp). Se diluyó la IgG anti-*F. hepatica* en amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.6 hasta obtener concentraciones de 20, 25 y 30 $\mu\text{g/ml}$, se cubrió cada pozo con 100 μl de la dilución por duplicado y se incubaron durante 12 horas a 4°C.

2.- Lavado de la placa: Se realizaron tres lavados de los pozos con 200 μl de SSAF adicionada con Tween-20 al 0.3% y ASB al 0.1 %. durante cinco minutos cada uno.

3.- Bloqueo de la placa: Se agregaron 100 μl /pozo de SSAF-Tween 0.3% y se incubó una hora a 37°C.

4.- Se repitió el paso 2.

5.- Adición de la muestra problema: Se adicionaron 100 μl de suero diluido en SSAF-Tween 20 al 0.3 %, 1:10, 1:5, 1:3 y sin diluir de los ovinos no infectados. Se prepararon diluciones seriadas del antígeno de *F. hepatica* en SSAF-Tween al 0.3%, se adicionaron 100 μl /pozo de cada dilución por duplicado y se incubó durante una hora a 37°C.

6.- Se repitió el paso 2.

7.- Adición del segundo anticuerpo: Se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo de revelado en SSAF hasta obtener concentraciones de 20, 25 y 30 $\mu\text{g/ml}$, se adicionaron 100 μl /pozo de cada dilución por duplicado y se incubó durante una hora a 37°C.

8.- Se repitió el paso 2.

9.- Adición del sustrato: Como sustrato se empleó 0-fenilendiamina en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.5 conteniendo 0.4 $\mu\text{l/ml}$ de peróxido de hidrógeno al 30%, se adicionarán 100 μl /pozo y se incubó a temperatura ambiente

durante cinco minutos en la obscuridad, la reacción se detuvo adicionando 50 μ l/pozo de ácido sulfúrico 1 M.

10.- Los valores de absorbancia fueron determinados en un lector (Bio-rad) a 492 nm.

Como muestras negativas se usaron sueros de los ovinos del grupo testigo no infectado, como muestras positivas se usaron sueros de ovinos del mismo grupo, a los que se les adicionaron 25 μ g/ml de antígeno de *F. hepatica*.

En la estandarización del ELISA para detección de antígenos de *F hepatica* en heces se siguió el mismo procedimiento utilizado para los sueros a excepción del bloqueo, el cual se realizó con SSAF-Tween 20 al 0.3 % mas ASB al 5%, se adicionaron 100 μ l/pozo y se incubó durante una hora a 37°C.

2.2.10. Determinación del criterio de positividad del ELISA.

El criterio de positividad en una muestra individual se determinó cuando su valor de absorbancia fue igual o mayor al punto de corte del ensayo. El punto de corte se obtuvo al sumar la media mas tres veces la desviación estándar (DE) de los valores de absorbancia observados en el grupo testigo de ovinos no infectados.

2.2.11. Capacidad del ELISA para detectar concentraciones conocidas de antígeno de E/S de *F. hepatica* en SSAF, suero y sobrenadante de heces.

La sensibilidad del ensayo para detectar concentraciones conocidas de antígeno de *F. hepatica* en SSAF, suero y sobrenadante de heces se probó mediante la titulación del antígeno mezclado con SSAF-Tween al 0.3%, suero concentrado o con sobrenadante de heces de ovinos no infectados. Se partió de una concentración inicial de antígeno de 100 μ g/ml, a partir de la que se hicieron diluciones dobles para obtener 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19,

0.09, 0.048, 0.024, y 0.012 $\mu\text{g/ml}$, estas concentraciones se probaron por duplicado en el ELISA.

2.2.12. Detección de antígenos heterólogos de parásitos con el sistema de anticuerpos policlonales anti-*F. hepatica*

Con el objeto de verificar si con el ensayo desarrollado se podían detectar antígenos de parásitos diferentes a *F. hepatica*, se probaron extractos antigénicos de *H. contortus*, *Paramphistomum spp*, *M. expansa*, *M. benedeni*, *A. suum*, *T. solium*, *adulto y metacestodo*, *M. hirudinaceus* y *T. spiralis*, todos los extractos se utilizaron a una concentración de proteína de 25 $\mu\text{g/ml}$ en SSAF, suero y en sobrenadante de heces de animales negativos.

2.2.13. Evaluación del número de parásitos recuperados la necropsia y su relación con la presencia de antígenos en suero y heces.

Al final del experimento se realizó la necropsia a todos los animales infectados, se examinó el hígado minuciosamente, se contaron todos los parásitos existentes, y se obtuvieron los promedios por grupo. Con estos resultados se procedió a realizar la correlación de los valores de absorbancia individual durante el transcurso de la infección con el número de parásitos a la necropsia.

2.2.14. Sensibilidad y especificidad del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* en ovinos infectados experimentalmente.

Especificidad: Es la capacidad de una prueba para identificar correctamente como negativos aquellos animales que realmente son negativos (Rosales, 1989). Los parámetros de especificidad del ensayo para detección de antígenos de *F. hepatica* en suero y heces de ovinos se determinaron utilizando los valores de absorbancia obtenidos en muestras de suero y heces tomadas al día cero de la infección de los 20 ovinos utilizados en el experimento.

Sensibilidad: Es la capacidad de una prueba para identificar correctamente como positivos aquellos animales que realmente son positivos (Rosales, 1989). Los parámetros de sensibilidad del ensayo para detección de antígenos de *F. hepatica* en suero y heces de ovinos se determinaron mediante los valores de absorbancia obtenidos a las nueve spi cuando todos los ovinos fueron positivos a la presencia de huevos en las heces.

De acuerdo con Rosales (1989), la sensibilidad y especificidad del ELISA empleado fueron evaluadas mediante el siguiente cuadro:

<i>Resultado de la prueba</i>	<i>Diagnóstico verdadero</i>		<i>Total</i>
	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

donde:

a= animales enfermos que fueron positivos a la prueba

b= animales sanos que fueron positivos a la prueba (falsos positivos)

c= animales enfermos que fueron negativos a la prueba (falsos negativos)

d= animales sanos que fueron negativos a la prueba

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las muestras tanto de heces como de suero se probaron por duplicado en el ELISA, el promedio de la absorbancia fue el valor que se consideró para cada muestra, estos datos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar si existía diferencia entre los valores de absorbancia obtenidos en los grupos infectados en comparación con el grupo testigo, mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Leach, 1982) utilizando el paquete estadístico EPISTAT.

Para determinar la relación entre antígenos en suero y heces con la carga parasitaria se realizó un análisis de correlación de rangos de Spearman (Leach, 1982). El coeficiente de correlación (r_s) se determinó mediante el paquete estadístico SAS. Se analizaron los valores de absorbancia desde la primera epí tanto en el suero como en las heces, correlacionándolos con el número de parásitos a la necropsia donde la variable independiente correspondió al número de fasciolas recuperadas a la necropsia y la variable dependiente a la absorbancia obtenida en el suero y el sobrenadante de heces.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las muestras tanto de heces como de suero se probaron por duplicado en el ELISA, el promedio de la absorbancia fue el valor que se consideró para cada muestra, estos datos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar si existía diferencia entre los valores de absorbancia obtenidos en los grupos infectados en comparación con el grupo testigo, mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Leach, 1982) utilizando el paquete estadístico EPISTAT.

Para determinar la relación entre antígenos en suero y heces con la carga parasitaria se realizó un análisis de correlación de rangos de Spearman (Leach, 1982). El coeficiente de correlación (r_s) se determinó mediante el paquete estadístico SAS. Se analizaron los valores de absorbancia desde la primera spi tanto en el suero como en las heces, correlacionándolos con el número de parásitos a la necropsia donde la variable independiente correspondió al número de fasciolas recuperadas a la necropsia y la variable dependiente a la absorbancia obtenida en el suero y el sobrenadante de heces.

3.- RESULTADOS

3.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Todos los ovinos adquirieron la infección, esto fue corroborado por la presencia de huevos en las heces, los cuales aparecieron en dos animales del grupo tres a partir de la octava spi, y a partir de la novena spi todos los animales resultaron positivos (Cuadro 1) aunque el examen coproparasitológico de sedimentación tuvo que repetirse hasta por tres ocasiones para detectar la presencia de huevos.

El número de parásitos recuperados a la necropsia estuvo en proporción con el número de metacercarias inoculadas, en el grupo 1 la recuperación de parásitos fue del 27.5%, en el grupo 2 del 36.2% y en el grupo 3 de 42.2% (Cuadro 2).

3.2. ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *F. hepatica* EN HECES Y SUERO DE OVINOS.

Los valores de absorbancia obtenidos al probar las diferentes concentraciones del antígeno, así como del primero y segundo anticuerpo se muestran en el cuadro 3 y la figura 1. En todas las combinaciones de anticuerpos usadas se observó una relación en proporción con la concentración del antígeno. Con base en los datos obtenidos y en las curvas de titulación, se decidió utilizar el ELISA con 25 µg/ml del anticuerpo de captura o primer anticuerpo y 30 µg/ml del segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa.

3.- RESULTADOS

3.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Todos los ovinos adquirieron la infección, esto fue corroborado por la presencia de huevos en las heces, los cuales aparecieron en dos animales del grupo tres a partir de la octava spi, y a partir de la novena spi todos los animales resultaron positivos (Cuadro 1) aunque el examen coproparasitológico de sedimentación tuvo que repetirse hasta por tres ocasiones para detectar la presencia de huevos.

El número de parásitos recuperados a la necropsia estuvo en proporción con el número de metacercarias inoculadas, en el grupo 1 la recuperación de parásitos fue del 27.5%, en el grupo 2 del 36.2% y en el grupo 3 de 42.2% (Cuadro 2).

3.2. ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *F. hepatica* EN HECES Y SUERO DE OVINOS.

Los valores de absorbancia obtenidos al probar las diferentes concentraciones del antígeno, así como del primero y segundo anticuerpo se muestran en el cuadro 3 y la figura 1. En todas las combinaciones de anticuerpos usadas se observó una relación en proporción con la concentración del antígeno. Con base en los datos obtenidos y en las curvas de titulación, se decidió utilizar el ELISA con 25 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de captura o primer anticuerpo y 30 $\mu\text{g/ml}$ del segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa.

3.2.1. Capacidad del ELISA para detectar concentraciones conocidas de antígeno de E/S de *F. hepatica* en SSAF, suero y sobrenadante de heces.

Los valores de absorbancia obtenidos en el ELISA para detección de antígenos de E/S de *F. hepatica* en SSAF, suero y heces mostraron una relación en proporción con la concentración de antígeno utilizado (Cuadro 4, Figura 2). El punto de corte para SSAF fue de 0.046, para suero de 0.240 y para sobrenadante de heces de 0.348. El límite de resolución del ELISA para detectar antígeno de E/S de *F. hepatica* se determinó como el valor inmediatamente superior al punto de corte del diluyente, de acuerdo a esto el límite de resolución fue de 12 η g/ml para SSAF, de 190 η g/ml para suero y de 90 η g/ml para sobrenadante de heces.

3.2.2. Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* en los tres grupos de ovinos infectados experimentalmente

Se procesaron las muestras semanales de heces y suero de los tres grupos de ovinos infectados semanalmente durante tres meses, así como las de los animales del grupo testigo. La infección en los animales infectados con *F. hepatica* fue corroborada por la presencia de huevos en las heces a partir de la octava spi y por la presencia de los parásitos a la necropsia; las muestras de ovinos del grupo testigo se utilizaron para obtener el punto de corte del ensayo (absorbancia \geq 0.240) y para diferenciar entre un animal positivo y uno negativo. Los antígenos en el suero comenzaron a detectarse en los ovinos a partir de la primera spi, aunque los valores de absorbancia mostraron diferencias significativas a partir de la segunda spi ($p < 0.05$). La figura 3 muestra el promedio de los valores de absorbancia de antígenos en suero durante el transcurso de la infección de los tres grupos de ovinos infectados y el grupo testigo.

En cuanto a la detección de antígenos en heces, los valores de absorbancia se mostraron por encima del punto de corte (absorbancia \geq 0.348) a partir de la

cuarta spi, manteniéndose positivos durante la infección hasta el momento de la necropsia, mientras que los valores de absorbancia del grupo testigo se mantuvieron por abajo del punto de corte durante todo el transcurso de la infección. No hubo diferencia estadística ($p>0.05$) en los valores de absorbancia obtenidos en los cuatro grupos en las semanas cero, uno, dos y tres; sin embargo, a partir de la cuarta spi los valores de absorbancia mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) en relación con el grupo testigo, mientras que entre los tres grupos infectados no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) durante el transcurso de la infección. La figura 4 muestra el promedio de los valores de absorbancia de los antígenos en heces durante el transcurso del experimento de los cuatro grupos de ovinos.

3.2.3. Valores de absorbancia obtenidos en suero, sobrenadante de heces, número de huevos y carga parasitaria en el grupo 1

En este grupo los valores de absorbancia en el suero se encontraron por encima del punto de corte a partir de la segunda spi, aunque en la cuarta spi hubo un descenso que hizo que el promedio en los valores de absorbancia se encontrara por abajo del punto de corte a las seis spi, a lo largo del tiempo que duró el experimento se observaron fluctuaciones en las absorbancias, de tal manera que se registraron los valores más altos a las siete y nueve spi, aunque en estas dos semanas también se registraron las DE más altas, y a partir de las 10 spi hubo una disminución en los valores, manteniéndose ligeramente igual o por encima del punto de corte en las posteriores observaciones, hasta el final del experimento; el grupo testigo se mantuvo siempre por debajo del punto de corte, y las DE fueron menores en comparación con el grupo infectado (Cuadro 5 y Figura 5).

En cuanto a los antígenos en heces, estos comenzaron a detectarse a partir de la cuarta spi, y se observó una DE alta, esto se explica porque solo cuatro animales fueron positivos en esta semana. A partir de la séptima spi, hubo un incremento en las absorbancias registrándose un pico a las ocho spi, tanto en esta semana como en la anterior la DE fue amplia, posteriormente estos valores descendieron y se mantuvieron positivos hasta el final del experimento, los valores de absorbancia en el grupo testigo se mantuvieron por abajo del punto de corte y las DE fueron pequeñas, no habiendo gran variación entre ellas en comparación con el grupo infectado (Cuadro 6, Figura 6).

La detección de huevos del parásito comenzó a las ocho spi encontrándose tres animales positivos con uno, dos y tres huevos por gramo de heces (hpgh), respectivamente, a las nueve spi, todos los animales fueron positivos, aunque el promedio fue más bajo (3 ± 2.3), la mayor cantidad de huevos registrada fue a las 12 spi, cuando se realizaron las necropsias, con un promedio de 31.8 ± 7.36 (Cuadro 1). La cantidad de parásitos recuperados fue de 68 con un promedio de 13.6 ± 3.43 por animal (Cuadro 2); en este grupo el porcentaje de fasciolas implantadas fue de 27.2%.

3.2.4. Valores de absorbancia obtenidos en suero, sobrenadante de heces, número de huevos y carga parasitaria en el grupo 2

Los valores de absorbancia en suero comenzaron a ser positivos a partir de la segunda spi, manteniéndose así hasta la quinta spi, donde hubo una ligera disminución en las observaciones, lo cual hizo que el promedio descendiera por debajo del punto de corte; posteriormente a las seis spi, los valores volvieron a aumentar, manteniéndose por encima del punto de corte hasta el fin del experimento. El promedio de absorbancias más alto se observó a las nueve spi, en donde también la DE fue mayor. En este grupo no hubo grandes diferencias en

las densidades ópticas (DO) registradas individualmente en cada uno de los muestreos, lo que reflejó unas DE menores a 0.1 en la mayoría de las observaciones (Cuadro 7, Figura 7).

Con relación a las absorbancias obtenidas en las muestras de heces, el promedio de los valores de absorbancia se mostraron por encima del punto de corte a partir de la cuarta spi, las observaciones más altas fueron obtenidas en las siete y ocho spi, el pico más alto se detectó a las siete spi, donde también se registró la DE más alta, esto se atribuyó a que en esta semana la absorbancia en uno de los animales fue alta, mientras que en otro ovino la absorbancia registrada fue similar al punto de corte del ensayo. A partir de la octava spi, los valores de absorbancia comenzaron a descender y se mantuvieron por encima del punto de corte hasta las 12 semanas cuando se realizaron las necropsias (Cuadro 8, Figura 8).

La presencia de huevos comenzó a detectarse a partir de la octava spi en tres animales, y a partir de la novena spi, todos los animales fueron positivos a la presencia de huevos con un promedio de 4.12 ± 4.28 , el conteo de huevos fue aumentando gradualmente cada semana, al final del experimento el promedio fue de 91.6 ± 49.97 (cuadro 1). El número de parásitos por animal recuperados a la necropsia fue de 181 en total con un promedio de 36.2 ± 16.23 (cuadro 2). El porcentaje de implantación fue de 36.2%.

3.2.5. Valores de absorbancia obtenidos en suero, sobrenadante de heces, número de huevos y carga parasitaria en el grupo 3

En estos animales, la detección de antígenos en suero comenzó a partir de la primera spi en cuatro de ellos, la DE fue alta en esta semana, durante el transcurso de la infección el promedio de los valores de absorbancia

permanecieron por encima del punto de corte, los valores mas altos se registraron a las nueve spi, aquí también se encontró la DE mas alta; posteriormente los valores de absorbancia comenzaron a descender y se mantuvieron por encima del punto de corte hasta las 12 spi (Cuadro 9, Figura 9).

Los valores de absorbancia en las heces estuvieron por encima del punto de corte a partir de la cuarta spi, manteniéndose de esta manera durante toda la infección. El primer incremento se observó a las cinco spi, las DO continuaron en ascenso, observándose las mas altas a las siete spi, posteriormente comenzaron a descender a las ocho spi, aunque siempre estuvieron por arriba del punto de corte hasta el fin del experimento; las DE mas altas fueron las correspondientes a las semanas ocho y nueve, cuando se registró la mayor variación entre los valores de absorbancia (Cuadro 10, Figura 10).

La detección de huevos de *F. hepatica* comenzó a ser positiva a partir de las ocho spi, mientras que en la novena spi, todos fueron positivos, la mayor cantidad de huevos se obtuvo a las 11 spi con un promedio de 90.8 ± 59.09 , y a las 12 spi con un promedio de 194.2 ± 167.8 (Cuadro 1) este grupo también fue el que registró la mayor cantidad de parásitos por animal, en total se obtuvieron 422, con un promedio de 84.4 ± 2.96 (Cuadro 2), el porcentaje de implantación fue de 42.2%.

3.2.6. Captura de antígenos heterólogos de parásitos por medio del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica*

La captura de antígenos heterólogos con el ELISA desarrollado se probó con extractos de los siguientes parásitos: *T. solium* adulto y metacestodo, *Moniezia expansa*, *M. benedeni*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Paramphistomum*, y *Haemonchus contortus* a concentraciones de 25 µg/ml en SSAF, suero y

sobrenadante de heces. Todos los valores de absorbancia estuvieron por abajo del punto de corte, no se encontró reacción cruzada con ninguno de los diferentes extractos probados. Los resultados obtenidos en el suero se muestran en el cuadro 11, y la figura 11 y los obtenidos en las heces en el cuadro 11, figura 12.

3.2.7. Evaluación de la carga parasitaria y su relación con la detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA

El coeficiente de correlación (r_s) comenzó a ser significativo desde la segunda spi cuando comenzó la detección de antígenos en suero, con un valor de 0.82, la correlación varió en cada una de las spi. Como el valor mas confiable se tomó el obtenido al final del experimento ($r_s = 0.77$, $p < 0.0001$) por ser el valor obtenido al tiempo que se obtuvieron los parásitos. El $r_s = 0.77$ indicó que existe una correlación lineal positiva, es decir, al aumentar la carga parasitaria, aumenta la cantidad de antígenos en el suero (Cuadro 12).

Con relación al r_s para antígenos en heces, éste inició a ser significativo a partir de la cuarta spi (0.63) cuando comenzó la detección de antígenos, como el valor mas confiable se tomó el obtenido al final del experimento ($r_s = 0.76$, $p < 0.0001$) por ser el valor determinado al tiempo que se obtuvieron los parásitos (cuadro 14). El $r_s = 0.76$ indicó que existe una correlación lineal positiva, al aumentar la carga parasitaria, aumenta la cantidad de antígenos en el sobrenadante de heces (cuadro 13).

3.2.8. Sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de antígenos de *F. hepatica* en suero y heces de ovinos infectados experimentalmente.

La sensibilidad se obtuvo con los valores de absorbancia obtenidos a las nueve spi y de acuerdo con la presencia de huevos en las heces.

a) Suero:

Animales infectados con *F. hepatica* que fueron positivos a la prueba = 13

Animales infectados con *F. hepatica* que fueron negativos a la prueba = 2

13

Sensibilidad (S) = ----- x 100 = 86.6 %

13 + 2

b) Heces:

Animales infectados con *F. hepatica* que fueron positivos a la prueba = 14

Animales infectados con *F. hepatica* que fueron negativos a la prueba = 1

14

Sensibilidad (S) = ----- x 100 = 93.3 %

14 + 1

La especificidad se obtuvo con los valores de absorbancia observados el día 0 en los 20 ovinos utilizados en el experimento.

a) Suero:

Animales no infectados que fueron positivos a la prueba = 0

Animales no infectados que fueron negativos a la prueba = 20

20

Especificidad (E) = ----- x 100 = 100%

0 + 20

b) Heces:

Animales no infectados que fueron positivos a la prueba = 0

Animales no infectados que fueron negativos a la prueba = 20

20

Especificidad (E) = ----- x 100 = 100%

0 + 20

4.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El diagnóstico de *F. hepatica* es de gran importancia en bovinos y ovinos debido a la alta receptividad a la infección en estas especies y a las pérdidas económicas que involucra la infección, principalmente en zonas endémicas, en donde las dificultades del diagnóstico clínico han conducido a establecer diferentes procedimientos de diagnóstico que permitan determinar la presencia del parásito en forma directa o indirecta (Sánchez, 1991).

El método mas utilizado en el diagnóstico de *F. hepatica* por su sencillez y economía, es el examen CPS de sedimentación (Sánchez, 1991). Por medio de este método es posible detectar los huevos del parásito en las heces de animales infectados después de las ocho a 10 spi, o en el periodo patente de la infección; este método tiene una baja sensibilidad y en ocasiones se requiere la realización de análisis seriados (Castro *et al*, 1994), por otro lado se estima que la sedimentación no permite detectar más del 50 % de bovinos infectados y que la mayoría de infecciones ligeras no son diagnosticadas por esta técnica (Sánchez, 1991). Deben considerarse además otros aspectos como la fluctuación de huevos en la ovoposición, ya que se ha mencionado que *F. hepatica* es más prolífica en ovinos que en bovinos y que dentro de la misma especie de *Fasciola* existen cepas mas prolíficas que otras. Otro aspecto que es importante señalar es que en algunas regiones coexiste la infección tanto de *F. hepatica* como de *Paramphistomum spp*, y la presencia de huevos de este último puede causar errores en la interpretación del diagnóstico (Sánchez, 1991). Aunado a la baja sensibilidad del examen CPS otro inconveniente es que detecta la infección cuando los parásitos se encuentran en su forma adulta y, por ende, ya existe daño hepático y aún cuando se de tratamiento químico habrá decomiso de los hígados en el rastro.

En el inmunodiagnóstico de fasciolosis se han desarrollado diversas pruebas serológicas encaminadas a la detección de anticuerpos, estas técnicas han demostrado su eficacia para determinar la presencia de *F. hepatica* sobre todo en infecciones experimentales; el método más usado es el inmunoensayo enzimático donde se han utilizado antígenos somáticos o productos de E/S provenientes de trematodos adultos; sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento indican que un método de diagnóstico serológico que se aplique a ovinos y bovinos solo es confiable si se aplica en rebaños, en consecuencia, no pueden usarse todavía para detectar la infección en animales aislados. De esta manera, se han reportado diversas pruebas para detección de anticuerpos anti-*F. hepatica* en bovinos (Farrell *et al.* 1981, Oldham, 1983, Hillyer *et al.* 1985, Hillyer y Soler, 1991 y Fernández *et al.* 1995), ovinos (Hillyer *et al.* 1985, Ruiz-Navarrete *et al.* 1985 y Hillyer y Soler, 1991), caprinos (Martínez *et al.* 1996), conejos (Hillyer y Soler, 1991), ratones (Hillyer y Sagramoso 1980 y Hillyer y Soler, 1991) y en humanos (Hillyer, *et al.* 1993, y Osman *et al.* 1995), todos estos estudios se basan en la detección de anticuerpos ya sea IgG o IgM. Al respecto; Arriaga (1996) menciona que el establecimiento de métodos de diagnóstico inmunoenzimático, enfocados a la detección de anticuerpos en el suero de los animales infectados ha sido fundamental para el diagnóstico de infecciones tempranas; sin embargo, la presencia de anticuerpos no es indicativa de una infección activa. Se ha demostrado, además, que los anticuerpos pueden estar presentes en animales que han estado expuestos al parásito sin llegar a contraer la enfermedad y en animales que han recibido tratamiento (Castro *et al.* 1994).

También se han desarrollado pruebas que detectan antígenos que se encuentran libres o formando complejos inmunes, lo cual evidencia en mayor grado la infección; en este contexto, Arriaga *et al.* (1987), determinaron la

presencia de complejos inmunes circulantes en suero de ovinos infectados con *F. hepatica* mediante la precipitación con polietilenglicol 600 (PEG), en ovinos positivos a *F. hepatica*. En este trabajo se demostró que la cantidad de proteína precipitada en los sueros de ovinos parasitados fue mayor en comparación con el grupo no infectado, además el promedio de consumo del complemento fue de 57% en los ovinos infectados y de 29% en los no infectados lo cual confirma que existen complejos inmunes presentes en suero de animales con fasciolosis.

En los últimos años los métodos de diagnóstico inmunológico se han encaminado a la detección de antígenos parasitarios en suero o en heces, ya que al detectar al agente etiológico se asegura el diagnóstico; así, se tienen pruebas inmunoenzimáticas que detectan antígenos de *F. hepatica* en ratones (Raymond y Hillyer, 1989), humanos (Espino *et al.* 1987 y Espino *et al.* 1990) y en ovinos (Rodríguez y Hillyer 1995).

De acuerdo con Reddington, *et al.* (1984) *F. hepatica* es un organismo que durante su desarrollo comparte antígenos que se encuentran presentes en todas las fases de su desarrollo, estos antígenos son de E/S, que se pueden detectar durante los períodos pre y pospatente de la infección, esto se pudo comprobar en el trabajo realizado por Espino *et al.* (1990) en donde se propone la detección de antígenos de E/S como una alternativa viable de diagnóstico durante el período prepatente en fasciolosis humana.

En el presente trabajo se estandarizó un ELISA de doble anticuerpo de captura, por medio del cual fue posible detectar antígenos de *F. hepatica* desde la primera spi en el suero de 4 ovinos del grupo 3, y a partir de la segunda spi los valores de absorbancia obtenidos en el ELISA fueron suficientes para realizar el diagnóstico, la máxima detección de antígenos se registró a las nueve spi, estos

resultados concuerdan con lo reportado por Rodríguez y Hillyer (1995) en ovinos, quienes desarrollaron un ELISA de doble anticuerpo de captura utilizando anticuerpos dirigidos contra productos de E/S de *F. hepatica*, detectando antígenos del parásito a partir de la segunda spi, con un máximo a las ocho spi, los resultados obtenidos en el presente trabajo también concuerdan con lo realizado por Espino *et al.* (1987 y 1990) en humanos donde demostraron que la detección de antígenos de *F. hepatica* en suero fue posible en pacientes cuando aún no se encontraban huevos en las heces, recalando con ello la importancia del diagnóstico durante el período prepatente.

La sensibilidad del ELISA desarrollado para suero de ovinos en el presente estudio fue de 86.6 %, el ensayo detectó 190 ng/ml, mientras que en el ELISA desarrollado por Espino *et al.* (1990) en humanos es de 100%, llegando a detectar hasta 25 ng/ml, y en pacientes con evidencia parasitológica la sensibilidad aumenta hasta 10 ng/ml, estas diferencias pueden deberse a dos razones, en estos dos estudios se utilizan sueros de dos especies diferentes, y a que en el presente trabajo se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra antígenos de E/S, como primer anticuerpo de captura, mientras que el ELISA desarrollado por Espino *et al.* (1990) utiliza como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal (ES78), una inmunoglobulina de ratón (IgG2a) la cual está dirigida contra productos de E/S, lo que elimina el fondo inespecífico del ensayo cuando se utilizan anticuerpos policlonales como el empleado en este estudio.

En cuanto a la especificidad del ELISA, ésta fue del 100%; no se encontraron reacciones cruzadas con extractos antigénicos de parásitos como *Paramphistomum spp*, *H. contortus*, *M. expansa*, *M. benedeni*, *M. hirudinaceus*, *T. spiralis*, *A. suum*, y *T. solium* adulto y metacestodo. En el trabajo reportado por Espino *et al.* (1990) la especificidad también fue del 100 %, aunque el ensayo se

probó con sueros de individuos con trichuriasis, ascariosis, eschistosomiosis, giardiosis, filariosis y amibiosis.

Recientemente el inmunodiagnóstico se ha enfocado a la detección de antígenos en heces de huéspedes infectados, ya que los parásitos liberan productos metabólicos o de sus componentes estructurales que se eliminan hacia las heces, estos antígenos pueden ser detectados por medio de pruebas inmunológicas como el ELISA, el cual ya ha sido empleado para el diagnóstico de rotavirus en heces de ratas, cerdos y bovinos (Vonderfecht *et al.* 1994), se ha utilizado también en la detección de la toxina A de *Clostridium difficile* en humanos (Viscidi *et al.* 1984), en protozoarios se tienen estudios en *G. lamblia* (Stibbs *et al.* 1988 y Vinayak, *et al.* 1991), y en *E. histolytica* (Randall, *et al.* 1984), En cestodos existe un número considerable de trabajos como el reportado por Allan, *et al.* (1990) en *T. solium*, en *E. granulosus* (Allan, *et al.* 1992, Baronet y Waltner-Toews, 1994 y Sakai *et al.* 1995), *Hymenolepis diminuta* (Allan y Craig, 1994), *T. saginata* (Desplazes, *et al.* 1991) y *T. hydatigena* (Desplazes *et al.* 1991). En nematodos se han desarrollado ensayos que detectan antígenos de parásitos adultos o larvas en las heces (Nageswaran *et al.* 1994, y Jonhson y Benke, 1996) o antígenos de superficie en *H. contortus* (Ellis, *et al.* 1993 y Sodd *et al.* 1996), en todos estos estudios la sensibilidad del ELISA para coproantígenos superó al CPS y las infecciones pudieron detectarse durante el periodo prepatente.

En trematodos, los ensayos para detección de antígenos en heces se han realizado en *F. hepatica* por ser el parásito más importante de este grupo. De esta manera existe un estudio realizado por El-Bali *et al.* (1992) en el que se propone la detección de un antígeno de 26 kDa, dicho antígeno podría ser un componente de E/S o del tegumento de *F. hepatica* el cual se mantiene estable en la bilis y las heces y se detecta mediante inmunoelectrotransferencia.

Espino y Finlay (1994) desarrollaron un ELISA de doble anticuerpo de captura mediante el cual es posible detectar antígenos de *F. hepatica* en heces de humanos, este ensayo se probó posteriormente en bovinos (Castro *et al*, 1995) y en ratas (Espino *et al*. 1997). El ensayo se basa en la utilización del anticuerpo monoclonal (ES78) como primer anticuerpo y como anticuerpo de revelado un policlonal producido en conejo y conjugado a peroxidasa para atrapar a los antígenos de E/S que se liberan en las heces, este ensayo tiene una capacidad de detección de 15 η g/ml, lo cual contrasta con el ensayo estandarizado en el presente estudio, que detecta 90 η g/ml, esto también se atribuye a que las pruebas se basan en muestras de heces de especies diferentes y sugiere la necesidad de utilizar anticuerpos monoclonales con el objeto de aumentar la sensibilidad en ensayos posteriores.

El ELISA estandarizado para la detección de antígenos en las heces en el presente trabajo mostró una especificidad del 100 %, no se encontró reacción cruzada con extractos de *Paramphistomum*, *H. contortus*, *M. expansa*, *M. benedeni*, *M. hirudinaceus*, *T. spiralis*, *A. suum*, y *T. solium* adulto y metacestodo; al respecto, Espino Finlay (1994) tampoco encontraron reacciones cruzadas al probar muestras de heces de humanos con diferentes parasitosis.

En este trabajo, el antígeno de E/S de *F. hepatica* se detectó en cantidades de 12 η g/ml en SSAF, 190 η g/ml en suero y 90 η g/ml en sobrenadante de heces de ovino; los valores obtenidos en SSAF concuerdan con lo reportado en trabajos anteriores (Espino *et al*. 1990) sin embargo, el límite de resolución para suero y sobrenadante de heces es menor a lo reportado anteriormente (Espino y Finlay, 1994 y Espino *et al*. 1997). En cuanto a los valores de absorbancia obtenidos en la curva de titulación del antígeno en SSAF, suero y sobrenadante de heces,

éstas mostraron, una relación proporcional a la concentración de antígeno, lo cual concuerda con el estudio realizado por Avila (1992) en donde también se encontró una relación proporcional en los valores de absorbancia en relación a la cantidad de antígeno somático de *T. solium* utilizado. Los valores de absorbancia registrados en las curvas de titulación del antígeno de E/S en el suero y las heces fueron mayores en comparación con los obtenidos en SSAF; además, el punto de corte y el límite de resolución difieren entre los tres diluyentes, esto se atribuyó a que los componentes presentes en el suero y las heces hacen que el fondo inespecífico del ensayo se eleve.

El ELISA basado en el sistema de doble anticuerpo de captura permitió diagnosticar la infección en ovinos durante el periodo prepatente, mas tempranamente en suero que en heces y con una especificidad del 100% en ambas pruebas. Por otro lado; existen trabajos que demuestran que *F. hepatica* comparte antígenos con *S. mansoni* y *F. gigantica*, lo cual produce reacciones cruzadas con estos parásitos cuando se realizan pruebas para detección de anticuerpos (Hanna y Hillyer, 1984 y Rodríguez y Hillyer, 1995). En este ensayo se elimina la posibilidad de reacciones inespecíficas al detectar antígenos en lugar de anticuerpos mediante el sistema de doble anticuerpo de captura, Desafortunadamente no fue posible probar el ensayo con antígenos de *S. mansoni*, *F. gigantica*, y *Dicrocoelium dendriticum*, los que por su cercanía filogenética a *F. hepatica* pudieran dar reacción cruzada; sin embargo, en México no existen informes sobre la presencia de los dos primeros, con respecto a *D. dendriticum* Basurto y Peláez (1970) publicaron el hallazgo de este trematodo en un bovino sacrificado en el rastro municipal de Tlalnepantla y recientemente se informó el hallazgo en un hígado de bovino sacrificado en el rastro de Tulancingo, Hgo. (Quiroz, *et al.* 1997), en los dos reportes se desconoce la procedencia de los animales por lo que es probable que la infección no haya ocurrido en el país,

lo que sugiere que no existen mayores problemas para la utilización de la prueba en campo, aunque otros estudios deben realizarse con el fin de probar extractos antigénicos de los parásitos mencionados.

En un estudio previo realizado en teniosis por *T. solium*, se demostró que existe una relación directa de la cantidad de parásitos con la absorbancia de antígenos en las heces (Avila, 1992), lo anterior concuerda con lo obtenido en este trabajo en el que también se pudo comprobar que existe una relación directa del número de fasciolas con la absorbancia de antígenos presentes en el suero y las heces; Lo anterior también fue reportado por Sakai *et al.* (1996) quienes mencionan que existe una correlación entre la carga parasitaria y las densidades ópticas obtenidas en el ELISA para coproantígenos en *E. multilocularis*. Al respecto, Johnson y Behnke (1995), encontraron que existe una relación entre la cantidad de *Heligmosomoides polygyrus* con la absorbancia de antígenos en heces de ratones infectados experimentalmente. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Allan y Craig (1994), en donde indican que no existe relación entre carga parasitaria y niveles de coproantígenos en *H. diminuta*.

En el presente trabajo se encontró que la cantidad de parásitos recuperados del hígado de los ovinos infectados estuvo en proporción con la cantidad de metacercarias inoculadas, obteniéndose un promedio de fasciolas de 13.6, 36.2 y 84.4 en los grupos 1, 2 y 3 respectivamente, los valores de absorbancia obtenidos en el suero del grupo 3 infectado con el mayor número de metacercarias fueron los más altos, lo cual hace suponer que existe una relación entre la cantidad de metacercarias inoculadas con las DO. La absorbancia más alta de antígenos en heces se observó entre las ocho y nueve spi, esto puede deberse a que en este tiempo los parásitos alcanzan la madurez sexual, y comienzan a liberar huevos y los productos del metabolismo son mayores debido al tamaño que alcanzan las

fasciolas, lo anterior hace que las absorbancias registradas en el ELISA sean mayores. Posteriormente, las DO aunque continuaron por arriba del punto de corte disminuyeron, esto pudo deberse a que exista mimetismo por parte del parásito o a la presencia de complejos inmunes que impidan que los antígenos sean detectados en el ELISA.

El objetivo de proponer el ELISA para detección de antígenos en suero y heces, en comparación con el método de sedimentación, fue corroborado en este estudio, al demostrar que los antígenos circulantes pudieron detectarse durante el período prepatente y comenzando a partir de la segunda spi, los valores de absorbancia registrados en los grupos de ovinos infectados se mostraron igual o por encima del punto de corte, mientras que los valores de absorbancia del grupo testigo se mantuvieron por abajo del punto de corte durante el transcurso de la infección. También se encontraron diferencias significativas en los tres grupos de ovinos infectados en comparación con el grupo testigo ($p < 0.05$), los valores de absorbancia obtenidos durante la infección mostraron un aumento considerable a partir de las semanas siete y ocho en los grupos 1 y 2, mostrando las máximas lecturas en la semana nueve para declinar posteriormente. En cuanto al grupo 3, los valores de absorbancia comenzaron a aumentar a partir de la primera spi, manteniéndose así hasta la octava spi, para mostrar las máximas lecturas en la semana nueve y declinar posteriormente. Se detectaron variaciones muy altas en cuanto a los valores de absorbancia, sobre todo en la novena semana, de esta manera se observó que las DE al principio de la infección fueron pequeñas y que la mayor DE se obtuvo en el grupo 1 a las siete spi, y en los grupo 2 y 3 a las siete y nueve spi; estos aumentos en la DE coinciden con el tiempo en que los parásitos ya son adultos y el contenido de antígeno que liberan a la circulación es mayor, también se atribuye a un aumento en la actividad fisiológica de los parásitos en los conductos biliares.

Con respecto a la detección de antígenos en las heces, los valores de absorbancia comenzaron a mostrarse por encima del punto de corte a partir de la cuarta semana, y a partir de entonces el análisis estadístico comenzó a mostrar diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tres grupos de ovinos infectados, en comparación con el grupo testigo, en donde los valores de absorbancia registrados se mantuvieron por debajo del punto de corte durante el tiempo que duró la infección. Estos valores comenzaron a aumentar paulatinamente desde la cuarta semana manteniéndose en forma muy similar en los tres grupos infectados, los valores más altos se registraron en la semana siete en los grupos 2 y 3 y en el grupo 1 en la semana ocho, para comenzar a declinar en la semana nueve, las variaciones obtenidas en los valores de absorbancia se evaluaron mediante la DE y se observó que en el grupo 1 las DE más altas se registraron en las semanas seis, siete y ocho, en el grupo 2 en la semana siete, mientras que en el grupo 3 las DE más altas se registraron en la semana siete y ocho, esto se atribuyó a que en este tiempo los parásitos ya se encuentran en su forma adulta y establecidos en los conductos biliares (Bautista, 1993) lo que hace que descarguen un mayor contenido de antígenos y estos puedan detectarse en las heces de los animales infectados. La gran variación entre la absorbancia de antígenos también puede deberse a la dilución de éstos en el tracto intestinal, a la actividad fisiológica de los mismos y a la presencia de huevos en las heces.

El objetivo de determinar el tiempo de aparición de antígenos de *F. hepatica* en el suero y las heces de ovinos fue posible en este trabajo, donde también se logró estandarizar un ELISA con 100 % de especificidad tanto en el suero como en las heces; sin embargo, la sensibilidad del ensayo no se logró en un 100 %, por lo que se sugiere el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de E/S los cuales se pueden utilizar como anticuerpos de captura en el ELISA

para detección de antígenos tanto en el suero (Espino *et al.* 1990) como en las heces (Espino y Finlay 1994) o la elaboración de antígenos purificados para la obtención de anticuerpos que detecten antígenos que permanecen estables en las heces (El-Bali, *et al.* 1995).

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el diagnóstico de la infección por *F. hepatica* en ovinos infectados experimentalmente, mediante el ELISA de captura pudo realizarse tanto en suero como en heces durante el periodo prepatente, cuatro a cinco semanas antes de que los huevos pudieran encontrarse en las heces, ya que estos comenzaron a detectarse a partir de la octava spi por sedimentación solo en ocho animales (53 %), siendo necesario repetir el CPS en dos o tres ocasiones debido a que en esta semana el promedio de huevos de los animales positivos fue muy bajo (2 ± 0.9), y hasta las nueve spi todos los animales fueron positivos a la presencia de huevos del trematodo, demostrando con ello la superioridad de los dos ensayos implementados en este trabajo. Por lo anterior, se puede afirmar que la detección de antígenos de *F hepatica* en el suero y las heces mediante el ELISA de captura ofrece una alternativa viable para el diagnóstico en ovinos y que el uso combinado de esta prueba, con los métodos tradicionales de diagnóstico y la información previa del problema contribuirá a mejorar e implementar programas de control tendientes a disminuir la enfermedad producida por este parásito.

5.- LITERATURA CITADA

- 1.- Acha, P. y Szyfres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a. ed., OPS-QMS, pp. 689-696.
- 2.- Aguilera, W. X., Miranda, C. y Vega, F.I., (1995). Fasciolosis humana en Chile. *Parasitol. Día.* 19: 163.
- 3.- Allan, J.C., Avila, G., García N. J., Flisser, A. and Craig, P. S., (1990). Inmunodiagnosis of teniasis by coproantigen detection. *Parasitology.* 101: 473 - 477.
- 4.- Allan, J. C. and Craig, P.S., (1992). Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and teniasis in dogs and humans. *Parasitology.* 104: 347-355.
- 5.- Allan, J. C and Craig, P. S., (1994). Partial characterization and time course analysis of *Hymenolepis diminuta* coproantigens. *J. Helminthol.* 68:97-103.
- 6.- Arriaga, M. C., Ruiz-Navarrete, A., Fraire, M., Bautista, C. R. y Morilla, A., (1987). Complejos inmunes circulantes en ovinos infestados con *Fasciola hepatica*. *Rev. Lat. Microbiol.* 29: 127- 132.
- 7.-Arriaga, M. C., Paniagua, R., Ruiz N. A., Bautista, C. and Morilla, A., (1989). Comparison of Dot Enzyme-linked Immunosorbent assay (Dot-ELISA), Passive haemagglutination Test (PHT) and Thin layer Immunoassay (TIA) in the Diagnosis of Natural or Experimental *Fasciola hepatica* Infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 30: 197-203.
- 8.- Arriaga, D.C., (1996). Diagnóstico serológico de infecciones por helmintos en rumiantes, En: Curso-taller regional en epidemiología, diagnóstico y control de infecciones por helmintos en ganado. (Editores Quiroz, R.H., Ibarra, V.F. y Méndez, M. D.). México: Ed. FMVZ-UNAM y FAO, pp. 227-238.

- 9.- Avila, R. G., (1992). Detección de antígenos de *Taenia solium* en heces por un método inmunoenzimático. Tesis de maestría. *Fac de Med.*, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- 10.- Baronet, D., and Waltner-Toews, D. (1994) *Echinococcus granulosus* infections in the dogs of Kathmandu, Nepal. *Annals Trop. Med. Parasitol.* 88: 485 - 492.
- Basurto, L. A. y Peláez, D., (1970). Hallazgo de *Dicrocoelium lanceatum* (Stiles y Hassall, 1898). Memorias del II Congreso Latinoamericano de parasitología. México, D. F.
- 11.- Bautista, G. R., (1989). Inmunología de la Fasciolosis. En: Inmunología Veterinaria. (Editor, Morilla, G. A.). México: Ed.Diana, pp. 242-278.
- 12.- Bautista, G. R., (1991). Inmunodiagnóstico de Fasciolosis. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. (Editor, Quiroz, R.H.). México: Ed. UNAM., pp. 298-315.
- 13.- Bautista, G. R., (1993). Inmunobiología de la relación huésped-parásito en infestaciones por trematodos y cestodos. En: Tópicos de parasitología animal. (Editores Cruz, V. C., Morales, S. M. y Fernández, R. M.). Cuernavaca, Mor: Ed. Universidad Autónoma de Morelos, pp. 71-83.
- 14.- Benex, J., (1973). Etude comparative de diverses methodes de diagnostic immunologique de fasciolose hepato-biliaire experimentale du mouton et influence du traitement sur la resistance des anticorpus. *Bull. Soc. Paras. Exot.* 66: 116-118.
- 15.- Boray, J.C., (1967). The effect of host reaction to experimental *Fasciola hepatica* infections in sheep and cattle En: The reaction of the host to parasitism (Editor Soulsby, J. L.) Alemania: Ed. World Assoc. Adv. Parasitol, pp. 119- 122.
- 16.- Boray, J.C., (1969). Experimental fasciolosis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7: 95-210.

- 17.- Blancou, J., Bouchet, A. et Daynes, D., (1971). Etude sur L'allergie, les cours de L'infestation des bovines par *Fasciola hepatica*. *Rev. Elev. Med. Pays. Trops.* 24: 373-376.
- 18.- Boulard, Ch., Bouvry, M. et Argente, G., (1985). Comparision de la détection des foyers de Fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. *Rech. Vet.* 16: 363-369.
- 19.- Castellanos, A., Escutia, I. y Quiroz, H., (1992). Frecuencia de Fasiolasis hepática en bovinos sacrificados en las plantas tipo Inspección Federal en México de los años 1979-1987. *Vet. Méx.* 23: 339.
- 20.- Castro, J., Dumenigo, B. y Espino, A., (1994). Detección de coproantígenos para evaluar infección activa por *Fasciola hepatica* en ganado bovino. *Parasitol. Día* 18: 33-38.
- 21.- Chauvin, A., Bouvet, G. and Boulard, Ch., (1995). Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimentaly primary and secondary infection in sheep. *Int. J. Parasitol.* 25: 1227-1241.
- 22.- De Haro A. I., Salazar, S. P. M. y Cabrera, B. M., (1995). Diagnóstico morfológico de las parasitosis 2a. ed., México: Ed. Méndez editores, pp. 105-108.
- 23.- Desplazes, P., Gottstein, B., Stingelin, Y. and Eckert, J., (1990). Detection of *Taenia hydatigena* coproantigens by ELISA in dogs. *Vet. Parasitol.* 36: 91-103.
- 24.- Desplazes, P., Eckert, J., Paulowski, S., Machowska, L. and Gottstein, B., (1991). An Enzyme Lynked immunosorbent assay for diagnostic of *Taenia saginata* coproantigens in humans. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 391-396.
- 25.- Dunn, M. A., (1983). Helminología Veterinaria. México: Ed. Manual Moderno, pp. 111-115.

- 26.- El-Bali, M. M., Malone, J.B., Todd, W. J., and Schnor, K. L., (1992). Detection of stable diagnostic antigen from bile and feces of *F. hepatica* infected cattle. *Vet. Parasitol.* 45: 157-167.
- 27.- Ellis, T. M., Gregory, A., Turnor, M., Kalknoven, M. And Wroth, R.H., (1993). Detection of *Haemonchus contortus* surface antigens in faces from infected sheep. *Vet. Parasitol.* 51: 85-97.
- 28.- Engvall, E. and Perlmann, P., (1972). Enzyme-Linked Immunosorbent assay, ELISA. *J. Immunol.* 109: 129-135.
- 29.- Encinas, G. R., Quiroz, R. H., Guerrero, M. C. y Ochoa, G. P., (1989). Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería México. *Vet. Méx.* 20: 423-426.
- 30.- Enriquez, A. S., (1971). Evaluación de la prueba intradérmica y examen coproparasitoscópico en el diagnóstico de la Fasciolosis en bovinos. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 31.- Espino, A. M., Duménigo, B. E., Fernández, R. and Finlay, C. M., (1987). Immunodiagnosis of human fascioliasis by Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay using excretory-Secretory products. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 605-608.
- 32.- Espino, A. M., Dumenigo, B. E. Huesca, N. y Finlay, C. M., (1988). Mantenimiento *in vitro* de adultos de *Fasciola hepatica*: Obtención de antígenos de excreción-secreción. *Rev. Sal. Anim.* 10:287-293.
- 33.- Espino, A. M., Marcet, R., y Finlay, C., (1990). Detection of Circulating Excretory-Secretory Antigens in Human Fascioliasis by Sandwich Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay. *J. Clinic. Microbiol.* 28: 2637-2640.
- 34.- Espino, A. M. and Finlay, C. M., (1994). Sandwich Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay for Detection of Excretory Secretoy Antigens in Humans with Fasciolosis. *J. Clinic. Microbiol.* 32: 190-193.

- 35.- Espino, M. A., Marcet, R. and Finlay, M. C., (1997). *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimental infected rats. *Exp. Parasitol.* 2: 117-120.
- 36.- Faría, S. L. S., Ibarra V. F., Sánchez, S. M. R., Salcedo, E. R. y Quiroz, R. H., (1989). Valoración de los niveles de Gammaglutamil transpeptidasa y Aspartato amino transferasa en ovinos fasciolosos tratados con triclabendazol. Memorias del Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. México, D.F.
- 37.- Farrell, C. J., Shen, D. T., Wescott, R.B., and Lang, B.Z., (1981). An Enzyme-Linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 42: 237-240.
- 38.- Fernández, M., Bautista, C.R. e Ibarra, F., (1995). Evaluación de la prueba de DIG-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Fasciola hepatica* en ganado bovino. *Parasitol. Día*, 19: 4 -8.
- 39.- García, C L., Rodríguez, C. S., Bautista, G. R., (1996). Caracterización de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de excreción/secreción de *Fasciola hepatica* en ovinos tratados con adyuvante completo de Freund. *Tec. Pec. Mex.* 34: 136.
- 40.- Gómez, A., Arriaga, C. y Morilla, A., (1981). La prueba de Inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico serológico de Fasciolosis en bovinos y ovinos. Memorias de la V reunión anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F.
- 41.- Gorman, T., Concha, V., Fredes, F., Ferreira, A., Valdés, A., y Alcaíno, H., (1994). Detección de antígenos de interés diagnóstico en infecciones por *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Día*, 18: 26-32.
- 42.- Green, E. L., (1986). Immunological detection of parasite antigen in faeces. *Parasitol. Today*, 2: 198-199.

- 43.- Gupta, S. C. and Yadav, S. C., (1993). *Fasciola gigantica*: Somatic, and excretory/secretory antigens in the diagnosis of experimental fascioliasis. *Indian J. Anim. Sci.* 63: 1025-1027.
- 44.- Hanna, E. R. and Hillyer, G. V., (1984). *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: Immunofluorescent antigen localization and cross-reactivity. *Exp. Parasitol.* 57: 1-4.
- 45.- Haroun, T. M. and Hillyer G. V., (1986). Resistance to fasciolosis - A review. *Vet Parasitol.* 20: 63- 93.
- 46.- Hillyer G. V. and Soler, G. M., (1991). Initial feasibility studies of the FAST-ELISA for the immunodiagnosis of fasciolosis. *J. Parasitol.* 77: 362-365.
- 47.- Hillyer, G. V., Sánchez, Z. and Leon D., (1985). Immunodiagnosis of bovine Fasciolosis by Enzyme-Linked Immunosorbent assay and immunoprecipitation methods. *J. Parasitol.*, 4: 449-454.
- 48.- Hillyer, G. V., (1993). Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Día* 17: 130-136.
- 49.- Hillyer, G. V. and Sagramoso, L., (1980). Antibody responses in murine Schistosomiasis and Fascioliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 598-601.
- 50.- Hughes, D. L., Hanna, R. E. and Symonds, H. W., (1981). *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Exp. Parasitol.* 52: 271-279.
- 51.- Ibarra, V. F., Montenegro, C. N., Vera, M. Y. Vázquez, P. C. y Bautista, G. C. R., (1995). Valoración de DIG-ELISA en el diagnóstico de Fasciolosis bovina. *Vet. Méx.* 26:1.
- 52.- Jemly, M. H., Dorchies, P. et Magnaval, J. F., (1987). Application de la technique ELISA au diagnostic immunologique de la fasciolose ovine: Comparaison avec Le immunofluorescence indirecte et la double diffusion en gelose. *Reune. Med. Vet.* 138: 355-359.

- 53.- Johnson, M. J., and Benke, J. M., (1996). Detection of gastrointestinal nematodes by a coproantigen capture ELISA. *Res. Vet. Sci.* 60: 7-12.
- 54.- Kassai, T., Cordero, M. C., Euzeby, J., Gaafar, S., Hiepe, T. and Himcinas, C. A., (1988). Standardized Nomenclature of Animal parasite Disease (SNOAPAD). *Vet. Parasitol.* 29: 299-326.
- 55.- Knight, R. A., (1980). Response of lambs to challenge infections after repeated inoculations with *Fasciola hepatica* cysts. *Proc. Hel. Soc.* 47: 186- 191.
- 56.- Langley, R., y Hillyer, G. V., (1989). Detection of circulating parasite antigen in murine fascioliasis by two-site enzyme-linked immunosorbente assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 472-478.
- 57.- Leach, Ch., (1982). Fundamentos de Estadística, Enfoque no Paramétrico para Ciencias Sociales. México: Ed. Limusa, pp. 199-214.
- 58.- Lebrija, I. A., Gómez, A. A., Arriaga, M. C., Ibarra, V. F. y Morilla, A., (1981). Algunas características de las pruebas de Intradermorreacción para el diagnóstico de la Fasciolosis de los bovinos. *Vet. Méx.* 12-15.
- 59.- Levine, N. D. , (1973). Tratado de Parasitología Veterinaria., Zaragoza, Esp: Ed Acribia, pp. 59.
- 60.- Leviex, D. A. and Venien, A., (1992). An Improved passive hemagglutination test for the serological diagnosis in ovine Fasiolosis using the specific antigen F₂. *Vet. Parasitol.* 42:53-66.
- 61.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, R. J., (1951). Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biologic. Chemist.* 193: 265-275.
- 62.- Martínez, A., Martínez-Cruz, M. S., Martínez, F. J., Gutiérrez, P. N., y Hernández, S., (1996). Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by Enzyme immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 62: 247- 252.

- 63.- Morilla, A. G., Arriaga, M. C. y Gómez, A. A., (1979). Evaluación preliminar de la prueba de Inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico de la Fasciolosis en animales. *Vet. Méx.* 10:181-186.
- 64.- Morilla, A. C., Gómez, A. A., y Bautista, G. C. R., (1983). Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *F. hepatica* en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. *Téc. Pec. Méx.* 44:41-51.
- 65.- Melhorn, H. y Piekarski, G., (1993). Fundamentos de Parasitología Animal. Zaragoza, Esp: Ed. Acribia, pp. 157-167.
- 66.- Nageswaran, C., Craig, P. S. and Devaney, E., (1994). Coproantigens detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. *Parasitology* 108: 335-342.
- 67.- Oldham, G., (1983). Antibodies of *Fasciola hepatica* antigens during experimental infections in cattle measured by ELISA. *Vet. Parsitol.* 13: 151- 158.
- 68.- Osman, M. M, Shehab, A.Y., Masry, S. A., Helmy, M. H. and Farag, H. F., (1995). Evaluation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory (E/S) productos in diagnosis of acute human fasciolosis by IgM ELISA. *Trop. Med. Parasitol* 46: 115 - 118.
- 69.- Perera, G., (1995). *Fasciola hepatica*: Intermediate hosts in the Americas: Preliminary consideraciones for its eventual control. En: trematodiasis transmitidas por alimentos, Epidemiología, manejo clínico y control. Santiago de Chile: Ed. OPS-OMS pp. 1-19.
- 70.- Quiroz, R. H., Herrera, R. D. y Fernández C. L., (1973). Valoración de la Intradermorreacción en el diagnóstico de la Fasciolosis. *Vet. Méx.* 44: 236-239.
- 71.- Quiroz, R. H., (1984). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México, Ed. Limusa, pp. 242-244.

- 72.- Quiroz, R. H. y Faría, S. L., (1991). Diagnóstico enzimático de Fasciolosis. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre.(Editor Quiroz, R. H.). México: Ed. UNAM, pp. 314-334.
- 73.- Quiroz, R. H., (1995). Impacto económico, epidemiología, control y prevención de *Fasciola hepatica* en la ganadería. En: trematodiasis transmitidas por alimentos, Epidemiología, manejo clínico y control. Santiago de Chile: Ed. OPS-OMS, pp. 81-101.
- 74.- Quiroz, R. H., Ramos, M. E., Ríos, A. N., y Alcalá, J., (1997). Presencia de *Dicrocoelium dendriticum* en ganado bovino de Tulancingo Hidalgo, Mexico. Memorias del IV Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, Guadalajara, Jal., Mexico.
- 75.- Qureshi, T., (1995). Enzyme-lynked immunoelectrotransfer blot analysis of excretory-secretory proteins of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 58: 357-463.
- 76.- Randall, G. R., Goldsmith, R. S., Shek, J. Mehalko, S. y Haneyman, D. , (1984). Use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Entamoeba histolytica* antigen in faecal samples. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 593-595.
- 77.- Raymond, J. L. and Hillyer, G., (1989). Detection of circulating parasite antigen in murine fasciolosis by two-site Enzyme-Linked Immunosorbente Assays, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4: 472-478.
- 78.- Reddington, J. J, Leid, W. R. y Wescott, B. R., (1984). A review of the antigens of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 14: 209-229.
- 79.- Rivera, C., Santiago, N. and Hillyer, G. V., (1988). Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory productos of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74: 646-652.

- 80.- Rodríguez, P. and Hillyer, G., (1995). Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *F. hepatica*. *Vet. Parasitol.* 56: 57-66.
- 81.- Rosales, O. C. 1989. Seroepidemiología e Inmunidad de Hato. En: Inmunología Veterinaria. (Editor, Morilla G. A.). México: Ed. Diana, pp. 327-336.
- 82.- Ruiz-Navarrete, M. A., Arriaga de Morilla, C., Gómez, A. A., Bautista, C. R. y Morilla, A., (1985). Dinámica de la respuesta serológica de ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. *Tec. Pec. Mex.* 49: 78-86.
- 83.- Ruiz-Navarrete, M. A., Arriaga, C., Bautista, C. R., y Morilla, A., (1993). *Fasciola hepatica*: Characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. *Rev. Lat. Am. Microb.* 35: 301.
- 85.- Sakai, H., Malgor, R., Basmadjian, Y., Gallardo, R., Carmona, C., Sato, H., Oku, Y. and Kamiya, M., (1995). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs. *Vet. parasitol.* 44: 453-46.
- 86.- Sánchez, A. A., (1991). Diagnóstico de la Fasciolosis. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. (Editor, Quiroz, R. H.). México: Ed. UNAM, pp. 260-273.
- 87.- Sandeman, R. M. and Howell, M. J., (1981). Response of sheep to challenge infection with *F. hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 30: 294-297.
- 88.- Santiago, V. C., (1993). Análisis Inmunológico de *F. hepatica* obtenida de tres diferentes hospederos definitivos. Tesis de maestría, *Fac. de Ciencias Agropec.*, Universidad Autónoma de Morelos.
- 89.- Santiago, N. y Hillyer, G. V., (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74: 810- 810.
- 90.- Santiago, N., Hillyer, G. V., García, R. M. and Morales, H. M., (1986). Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infections in rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 135-140.

- 91.- Sexton, J. L., Milner, A. R., Campbell, M. J., (1991). Immunoprecipitation analysis of biosynthetically labelled antigens using sera from infected sheep. *Parasit. Immunol.* 13:105.
- 92.- Sinclair, K. B., (1962). Observations on the clinical pathology of ovine fasciolosis. *Br. Vet. J.* 118:37-53.
- 93.- Sinclair, K. B., (1970). The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. *Res. Vet. Sci.* 11:209-216.
- 94.- Sinclair, K. B., (1971). Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in sheep. *Br. Vet. J.* 127:125-136.
- 95.- Sood, M., Kaur, G., Parmar, A. and Kapur, J., (1996). Development of Dot-ELISA for detection of *Haemonchus contortus* antigen. *Helminthology* 33: 73-75.
- 96.- Soulsby, E. J. L., (1987). Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. 7a. Ed., México: Ed. Interamericana, pp. 4-40.
- 97.- Stibbs, H. H., Mansour, S. and Foster, M., (1988). Enzyme Immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* cyst antigens in formalin-fixed and unfixed human stool. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1665-1669.
- 98.- Vinayak, V. K., Dutt, P. and Puri, M., (1991). An immunoenzymatic dot-ELISA for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool eluates of clinical cases of giardiasis. *J. Immunologic. Met.* 137: 245-251.
- 99.- Viscidi, R., Laughon, B. E., Hanvanich, M., Barlett, J. G. and Yolken, R. H., (1984). Improved Enzyme Immunoassays for the detection of antigens in fecal specimens. Investigation and correction of interfering factors. *J. Immunol. Met.* 67: 129-143.
- 100.- Vonderfecht, S. L., Lindsay, D. A. and Eiden, J. J., (1994). Detection of rat, porcine, and bovine group B rotavirus in fecal specimens by solid- phase Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1107- 1108.

Cuadro 1
PROMEDIO DE HUEVOS DE *F. hepatica* POR GRAMO DE HECES EN
OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE*

<i>grupo</i> (<i>n</i> =5)	<i>Semanas postinfección</i>				
	8	9	10	11	12
1	2 ± 1	3 ± 2.3	3 ± 1.5	18.4 ± 4.7	31.8 ± 7.3
2	2.3 ± 1.15	4.12 ± 4.58	12.4 ± 8.76	40 ± 18.7	91.6 ± 49.9
3	1.5 ± 0.70	4.8 ± 3.11	12 ± 8.3	90.8 ± 59.1	194.2 ± 167.8

* Cada uno de los animales de los grupos 1, 2 y 3 recibió 50, 100 y 200 metacercarias de *F. hepatica* respectivamente por vía oral.

Cuadro 2
NÚMERO DE PARÁSITOS ADULTOS RECUPERADOS A LA NECROPSIA DE
OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE*

Grupo	Identificación	Parásitos	\bar{X}	Min	Max	DE	% de implantación
1	529	19	13.6	11	19	3.43	27.2
	540	12					
	533	15					
	522	11					
	527	11					
2	523	50	36.2	17	56	16.23	36.2
	502	56					
	534	17					
	549	29					
	517	29					
3	521	86	84.4	80	88	2.96	42.2
	547	84					
	539	84					
	509	80					
	514	88					

* Cada uno de los animales de los grupos 1, 2 y 3 recibió 50, 100 y 200 metacercarias de *F. hepatica* respectivamente por vía oral.

Min = Mínimo, Max = Máximo, DE = Desviación estándar, \bar{X} = Promedio

Cuadro 3

**VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS AL PROBAR DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ANTICUERPOS Y ANTÍGENO EN EL ELISA**

Antígeno $\mu\text{g/ml}$	Primer anticuerpo: 20 $\mu\text{g/ml}$		
	2do Ac:20 $\mu\text{g/ml}$	2do Ac: 25 $\mu\text{g/ml}$	2do Ac: 30 $\mu\text{g/ml}$
0	0.033	0.03	0.04
1	0.764	0.708	0.742
10	0.944	1.116	1.063
100	1.105	1.167	1.219
Antígeno $\mu\text{g/ml}$	Primer anticuerpo: 25 $\mu\text{g/ml}$		
	2do Ac:20 $\mu\text{g/ml}$	2do Ac: 25 $\mu\text{g/ml}$	2do Ac: 30 $\mu\text{g/ml}$
0	0.031	0.033	0.032
1	0.697	0.799	0.872
10	0.907	1.156	1.129
100	1.007	1.202	1.157
Antígeno $\mu\text{g/ml}$	Primer anticuerpo: 30 $\mu\text{g/ml}$		
	2do Ac:20 $\mu\text{g/ml}$	2do Ac: 25 $\mu\text{g/ml}$	2do Ac: 30 $\mu\text{g/ml}$
0	0.027	0.128	0.228
1	0.74	0.962	1.033
10	1.102	1.209	1.374
100	1.109	1.319	1.558

* 492 nm

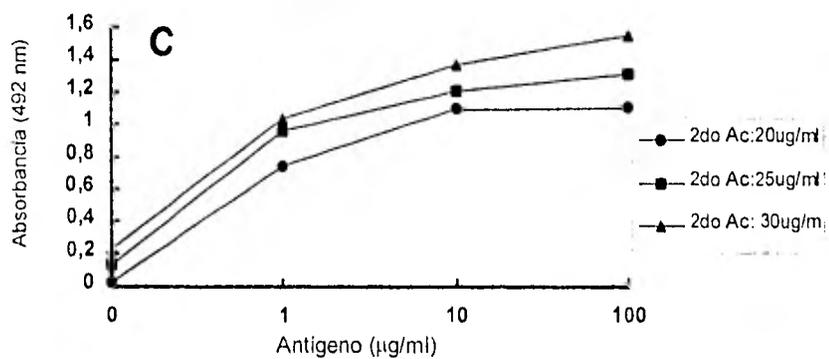
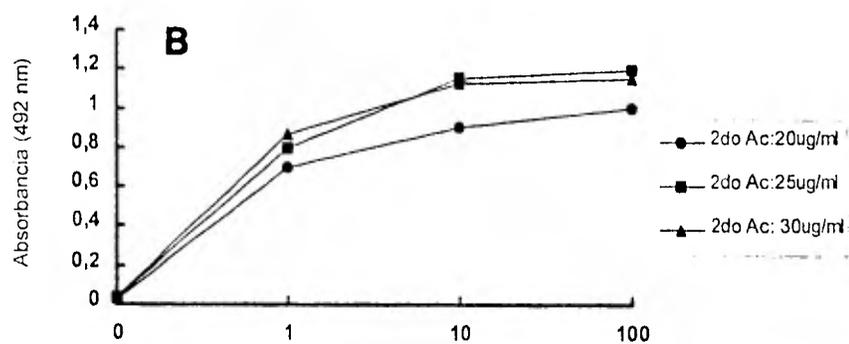
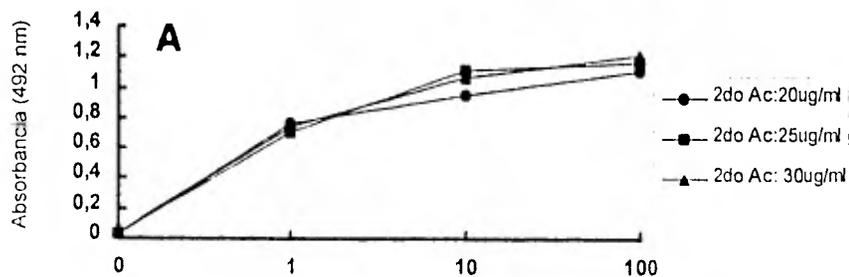


Figura 1: Valores de absorbancia obtenidos al probar diferente concentraciones de antígenos de E/S de *F. hepatica* y anticuerpos por medio del ELISA.

A) 1er Ac: 20 µg/ml, B) 1er Ac: 25 µg/ml C) 1er Ac: 30 µg/ml.

Cuadro 4
TITULACIÓN DEL ANTÍGENO DE E/S DE *F. hepatica* EN SSAF,
SUERO Y SOBRENADANTE DE HECES*.

<i>Antígeno (μg/ml)</i>	<i>SSAF</i>	<i>SUERO</i>	<i>SOBRENADANTE DE HECES</i>
0.012	0.066	0.057	0.22
0.024	0.129	0.06	0.228
0.048	0.138	0.063	0.309
0.097	0.201	0.173	0.351
0.195	0.21	0.235	0.467
0.39	0.274	0.234	0.723
0.78	0.296	0.263	0.905
1.56	0.323	0.366	1.17
3.12	0.355	0.573	1.557
6.25	0.349	0.956	1.92
12.5	0.406	1.201	1.952
25	0.532	1.39	1.98
50	0.862	1.41	2
100	1.041	1.48	2
<i>Punto de corte</i>	<i>0.049</i>	<i>0.240</i>	<i>0.348</i>

*Absorbancia a 492 nm

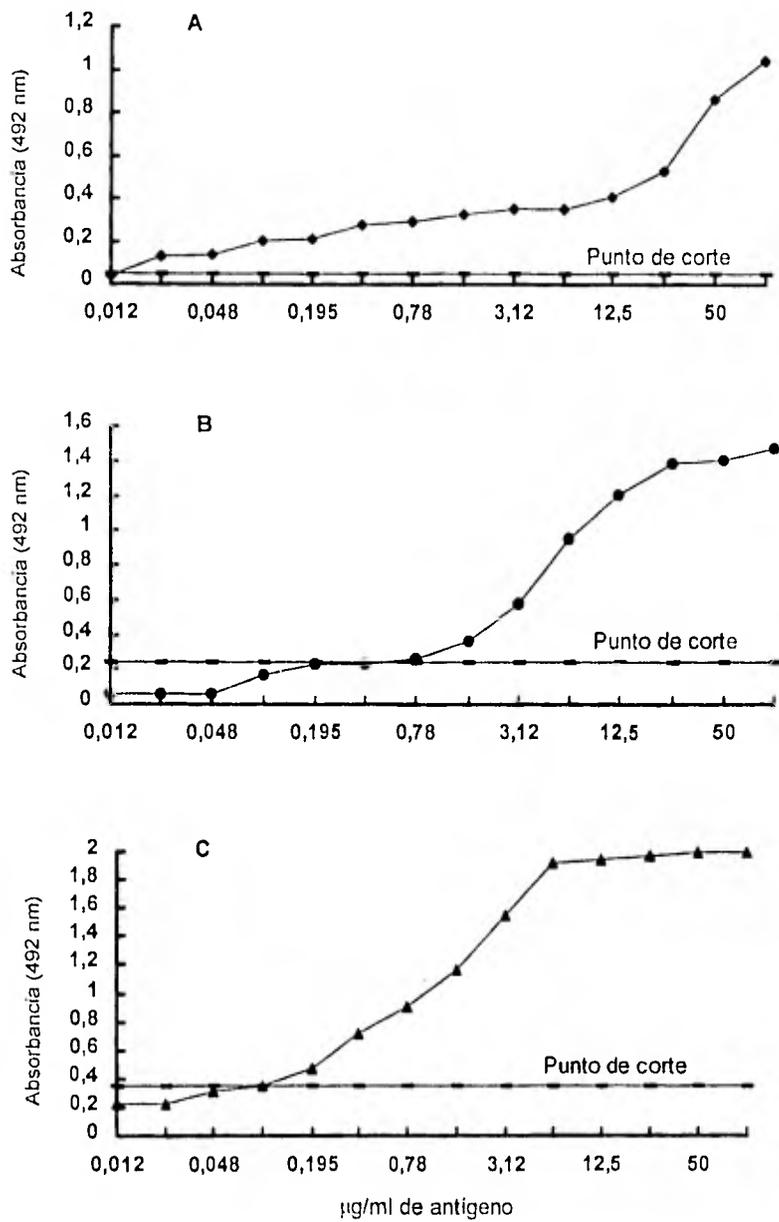


Figura 2: curvas de titulación del antígeno de E/S de *F. hepatica* por medio del ELISA.
 A) SSAF, B) suero y C) sobrenadante de heces.

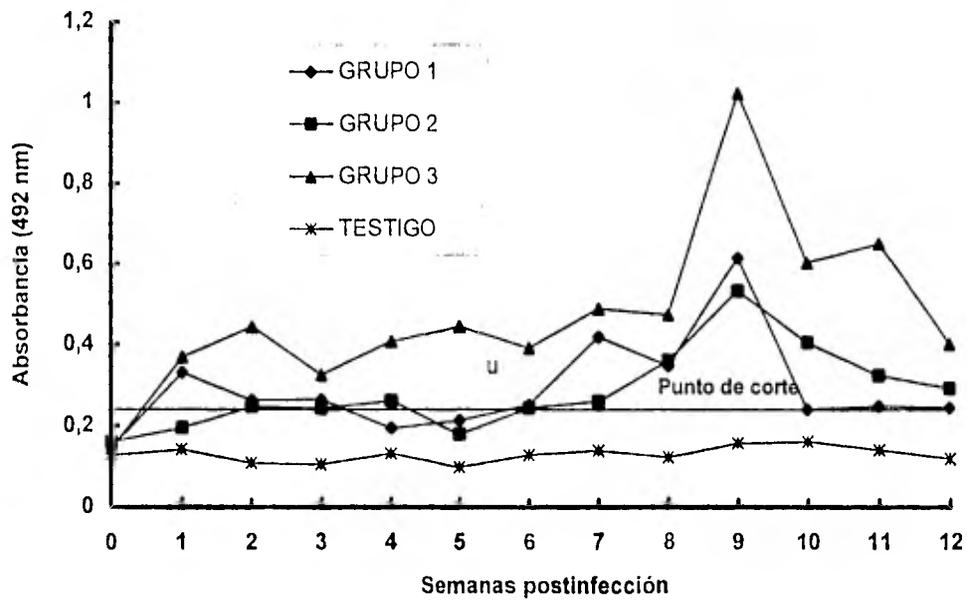


Figura 3: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* en suero en los tres grupos de ovinos infectados y en el grupo testigo. Cada punto representa el promedio de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente

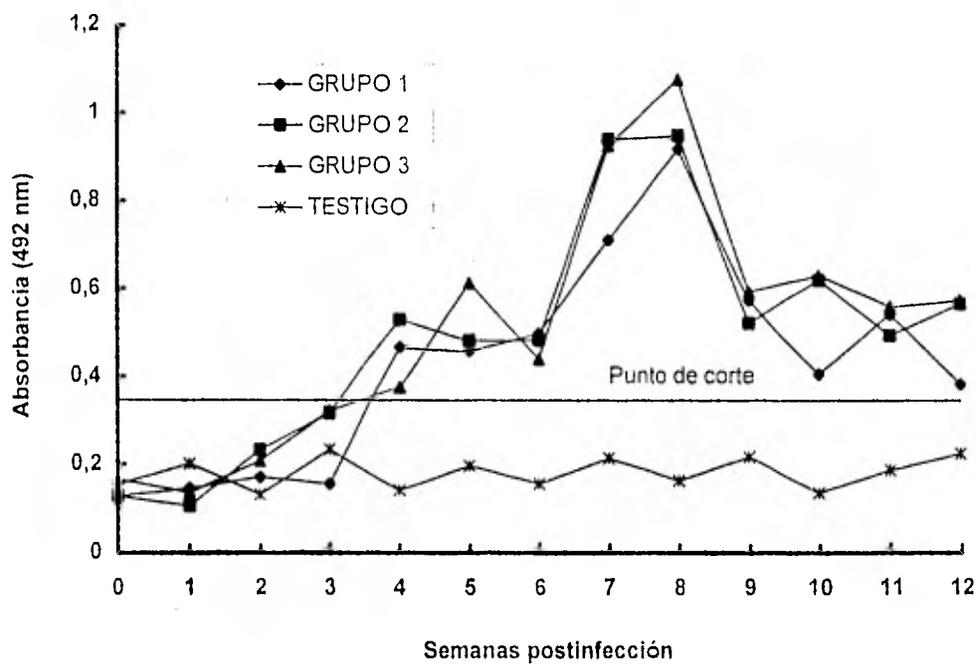


Figura 4: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* en heces en los tres grupos de ovinos infectados y en el grupo testigo. Cada punto representa el promedio de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente

Cuadro 5

VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS EN LOS SUEROS DEL GRUPO
1 INFECTADO CON 50 METACERCARIAS Y EN EL GRUPO TESTIGO.

Semanas postinfección	grupo 1		testigo	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D. E.
0	0.143	0.022	0.129	0.041
1	0.190	0.091	0.143	0.022
2	.0263	0.053	0.109	0.009
3	0.264	0.023	0.106	0.019
4	0.193	0.051	0.131	0.033
5	0.214	0.103	0.098	0.020
6	0.252	0.059	0.129	0.038
7	0.420	0.425	0.135	0.032
8	0.348	0.016	0.123	0.026
9	0.614	0.0452	0.157	0.041
10	0.241	0.085	0.162	0.042
11	0.249	0.017	0.141	0.053
12	0.246	0.014	0.120	0.014

*492 nm

X= Promedio

D.E.= Desviación estándar

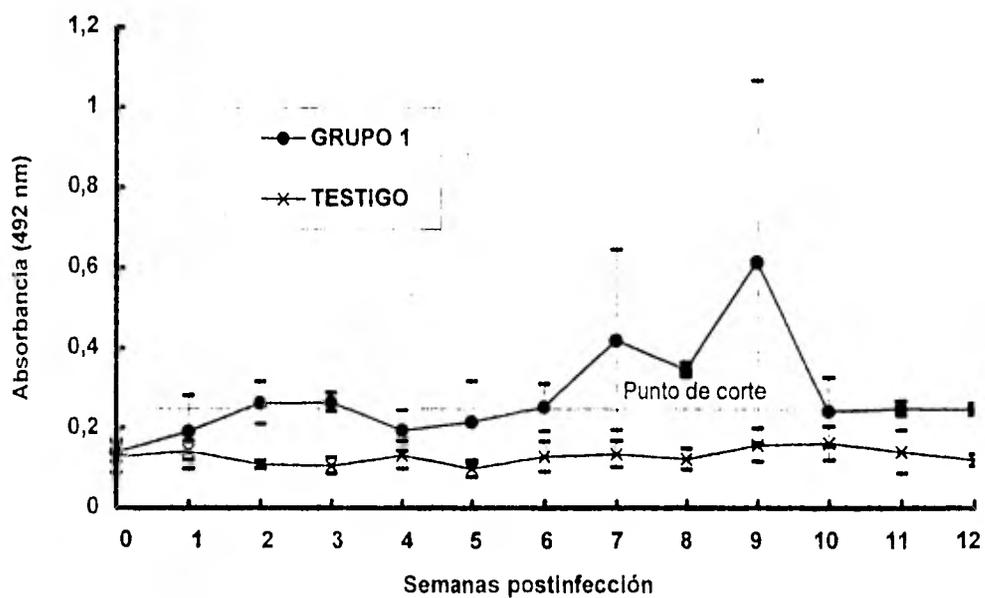


Figura 5: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA en suero de ovinos del grupo 1. Cada punto representa el promedio \pm la DS de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente

Cuadro 6
VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS EN SOBRENADANTE DE
HECES DEL GRUPO 1 INFECTADO CON 50 METACERCARIAS Y EN EL
GRUPO TESTIGO

Semanas postinfección	grupo 1		testigo	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.
0	0.133	0.006	0.145	0.020
1	0.145	0.047	0.140	0.069
2	0.171	0.060	0.152	0.052
3	0.161	0.066	0.144	0.035
4	0.467	0.228	0.233	0.052
5	0.452	0.096	0.145	0.047
6	0.498	0.313	0.165	0.086
7	0.713	0.446	0.209	0.046
8	1.003	0.357	0.106	0.038
9	.574	0.168	0.191	0.092
10	0.407	0.078	0.171	0.072
11	0.587	0.167	0.171	0.060
12	0.384	0.056	0.215	0.063

*492 nm

\bar{X} = Promedio

D.E.= Desviación estándar

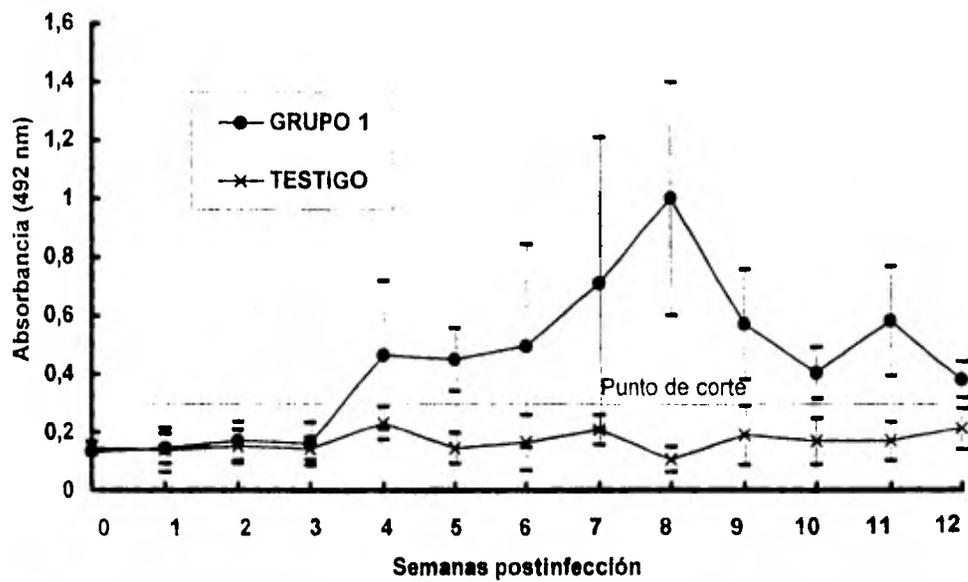


Figura 6: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA en heces de ovinos del grupo 1. Cada punto representa el promedio \pm la DS de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 7

VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS EN LOS SUEROS DEL GRUPO 2
INFECTADO CON 100 METACERCARIAS Y EN EL GRUPO TESTIGO

Semanas postinfección	grupo 2		testigo	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.
0	0.160	0.034	0.129	0.041
1	0.195	0.074	0.143	0.022
2	0.248	0.038	0.109	0.009
3	0.243	0.016	0.106	0.019
4	0.262	0.066	0.131	0.033
5	0.193	0.057	0.098	0.020
6	0.243	0.12	0.129	0.038
7	0.259	0.120	0.135	0.032
8	0.369	0.093	0.123	0.026
9	0.534	0.186	0.157	0.041
10	0.406	0.176	0.162	0.042
11	0.324	0.127	0.141	0.053
12	0.293	0.096	0.120	0.014

*492 nm

\bar{X} = Promedio

D.E.= Desviación estándar

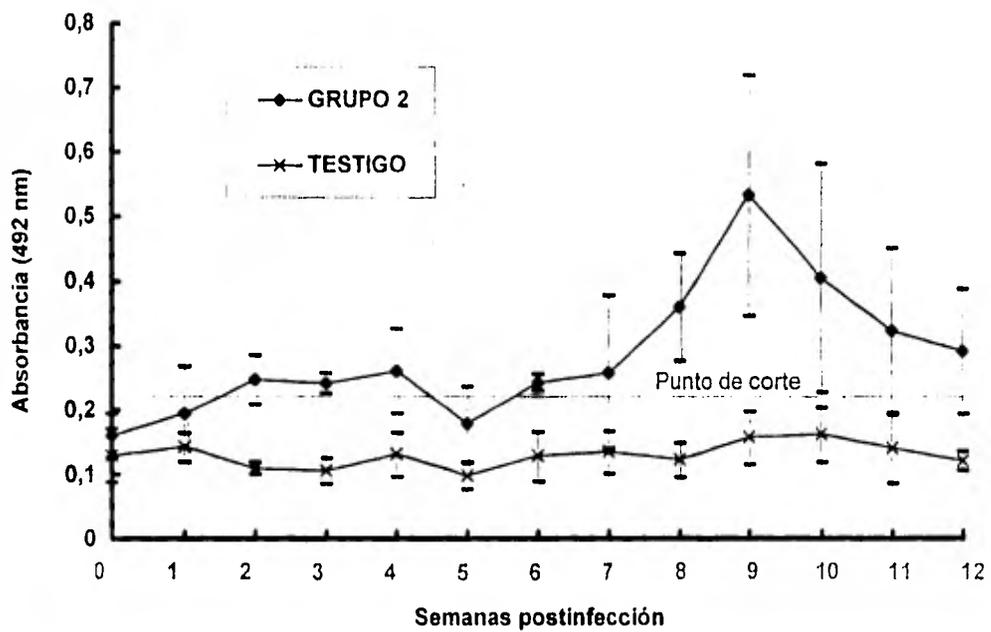


Figura 7: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA en suero de ovinos del grupo 2. Cada punto representa el promedio \pm la DS de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente.

Cuadro 8
VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS EN SOBRENADANTE DE HECES
DEL GRUPO 2 INFECTADO CON 100 METACERCARIAS Y EN EL GRUPO
TESTIGO

Semanas postinfección	grupo 2		testigo	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.
0	0.127	0.060	0.145	0.020
1	0.105	0.038	0.140	0.069
2	0.213	0.051	0.152	0.052
3	0.257	0.071	0.144	0.035
4	0.530	0.176	0.233	0.052
5	0.481	0.096	0.145	0.047
6	0.484	0.211	0.165	0.086
7	1.068	0.733	0.209	0.046
8	0.633	0.267	0.106	0.038
9	0.555	0.377	0.191	0.092
10	0.621	0.334	0.171	0.072
11	0.472	0.198	0.171	0.060
12	0.567	0.203	0.215	0.063

*492 nm

\bar{X} = Promedio

D.E.= Desviación estándar

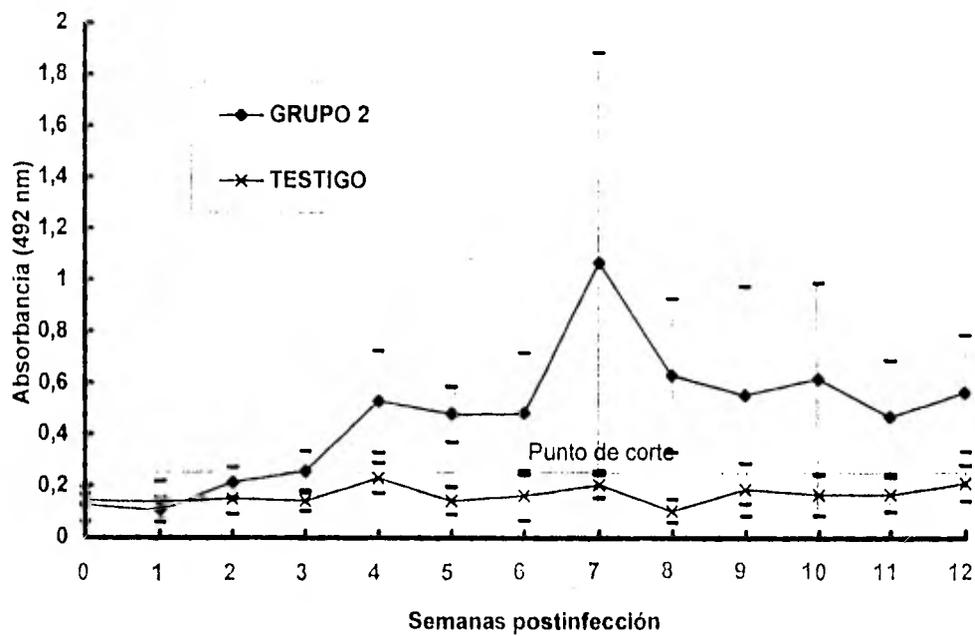


Figura 8: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA en heces de ovinos del grupo 2. Cada punto representa el promedio \pm la DS de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente.

Cuadro 9

**VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS EN LOS SUEROS DEL GRUPO 3
INFECTADO CON 200 METACERCARIAS Y EN EL GRUPO TESTIGO**

Semanas postinfección	grupo 3		testigo	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.
0	0.143	0.063	0.129	0.041
1	0.368	0.338	0.143	0.022
2	0.444	0.237	0.109	0.009
3	0.325	0.153	0.106	0.019
4	0.408	0.185	0.131	0.033
5	0.446	0.205	0.098	0.020
6	0.392	0.112	0.129	0.038
7	0.493	0.293	0.135	0.032
8	0.474	0.213	0.123	0.026
9	1.026	0.507	0.157	0.041
10	0.604	0.228	0.162	0.042
11	0.652	0.323	0.141	0.053
12	0.403	0.200	0.120	0.014

*492 nm

\bar{X} = Promedio

D.E.= Desviación estándar

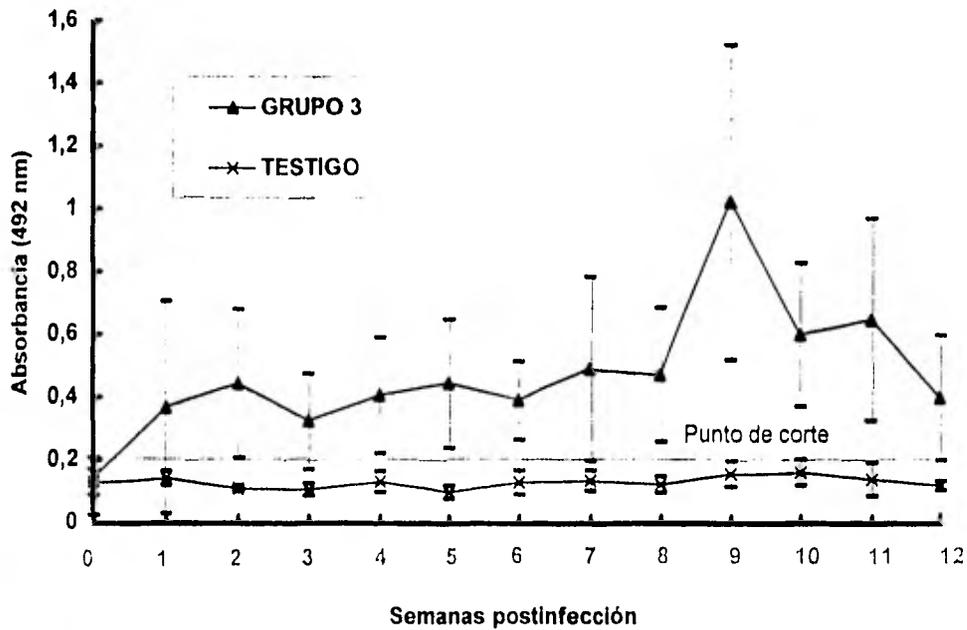


Figura 9: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA en suero de ovinos del grupo 3. Cada punto representa el promedio \pm la DS de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente.

Cuadro 10
VALORES DE ABSORBANCIA* OBTENIDOS EN SOBRENADANTE DE HECES
DEL GRUPO 3 INFECTADO CON 200 METACERCARIAS Y EN EL GRUPO
TESTIGO

Semanas postinfección	grupo 3		testigo	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.
0	0.166	0.045	0.145	0.020
1	0.135	0.053	0.140	0.069
2	0.208	0.046	0.152	0.052
3	0.243	0.095	0.144	0.035
4	0.412	0.046	0.233	0.052
5	0.646	0.413	0.145	0.047
6	0.509	0.151	0.165	0.086
7	1.220	0.545	0.209	0.046
8	0.978	0.526	0.106	0.038
9	0.614	0.149	0.191	0.092
10	0.632	0.380	0.171	0.072
11	0.451	0.217	0.171	0.060
12	0.576	0.102	0.215	0.063

* 492 nm

\bar{X} = Promedio

D.E.= Desviación estándar

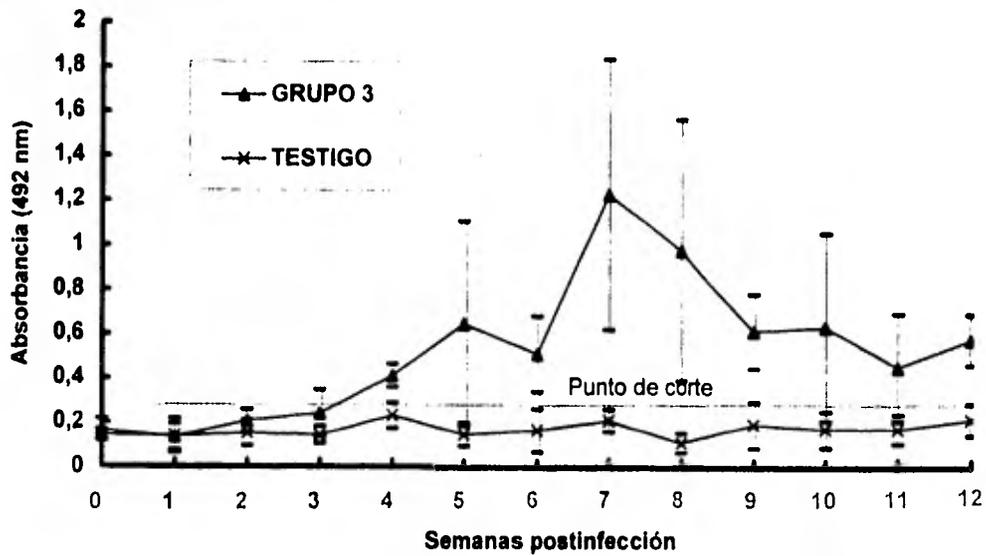


Figura 10: Dinámica de detección de antígenos de *F. hepatica* por medio del ELISA en heces de ovinos del grupo 3. Cada punto representa el promedio \pm la DS de los valores de absorbancia obtenidos semanalmente.

Cuadro 11
CAPTURA DE ANTÍGENOS HETERÓLOGOS EN EL ELISA PARA
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *F. hepatica* EN SUERO Y HECES

Antígenos parasitarios 25 µg/ml	Absorbancia a 492 nm	
	Suero	Heces
<i>Fasciola hepatica</i>	1.022	1.64
<i>Taenia solium</i> (adulto)	0.070	0.120
<i>T. solium</i> (metacestodo)	0.058	0.106
<i>Haemonchus contortus</i>	0.036	0.134
<i>Moniezia expanza</i>	0.036	0.144
<i>M. benedeni</i>	0.038	0.165
<i>Paramphistomum spp.</i>	0.046	0.175
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	0.068	0.116
<i>Trichinella spiralis</i>	0.048	0.123
<i>Ascaris suum</i>	0.064	0.098
SSAF-T 0.3%	0.038	0.038
Suero	0.032	-
Sobrenadante de heces	-	0.148

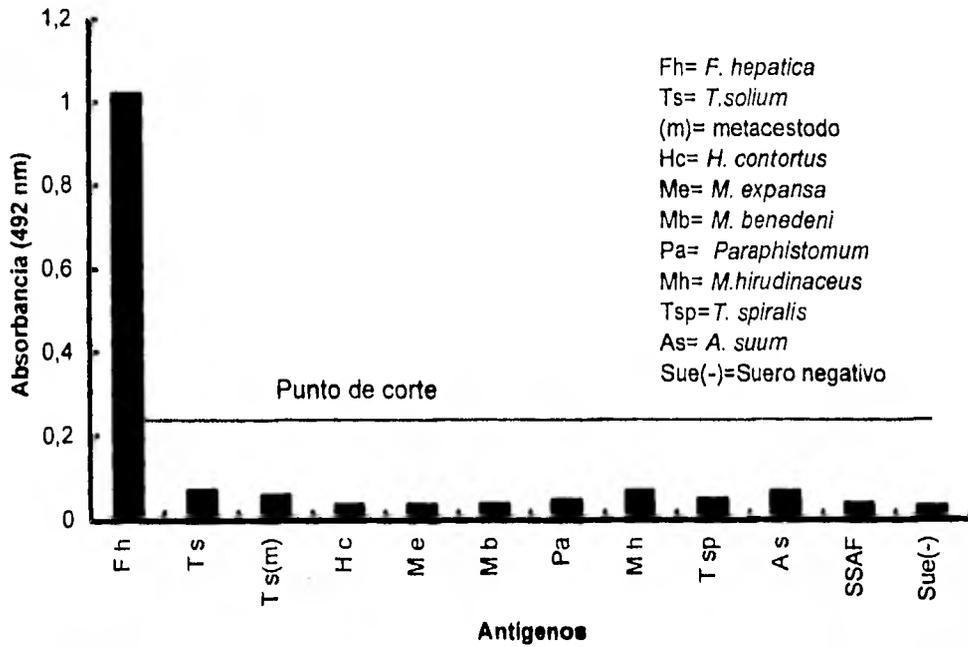


Figura 11: Evaluación del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* en suero de ovinos. Todos los antígenos se probaron a una concentración de proteína de 25 µg/ml

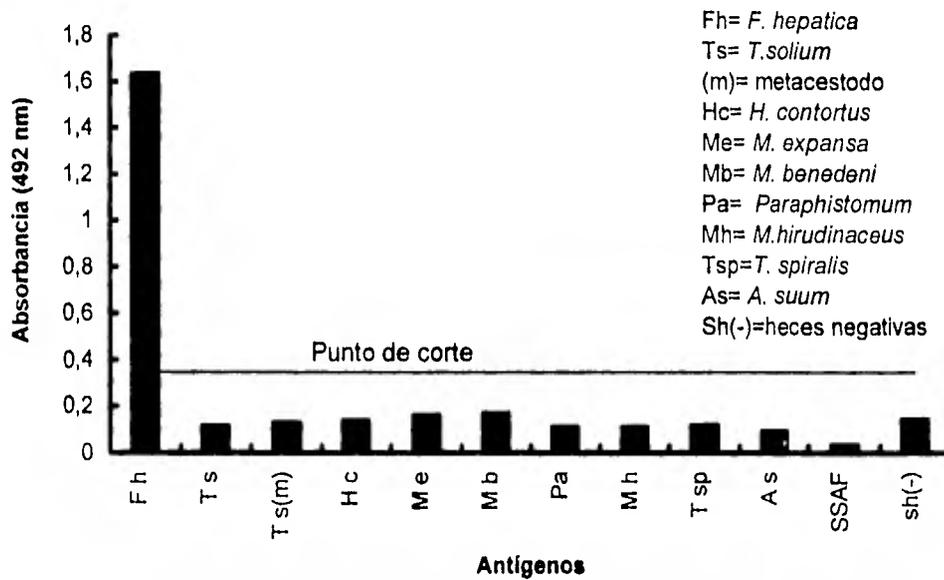


Figura 12: Evaluación del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* en heces. Todos los antígenos se probaron a una concentración de proteína de 25 µg/ml.

Cuadro 12
RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE PARÁSITOS RECUPERADOS A LA
NECROPSIA Y LA ABSORBANCIA* DE ANTÍGENOS EN EL SUERO DE
OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

Grupo	Parásitos	Semanas postinfección			
		2	4	8	12
1	19	0.255	0.189	0.339	0.236
	12	0.336	0.192	0.369	0.264
	15	0.286	0.148	0.330	0.228
	11	0.249	0.161	0.339	0.248
	11	0.190	0.279	0.363	0.256
2	50	0.307	0.204	0.487	0.460
	56	0.218	0.375	0.386	0.236
	17	0.254	0.255	0.342	0.296
	29	0.253	0.228	0.263	0.236
	29	0.210	0.249	0.326	0.237
3	86	0.430	0.630	0.494	0.340
	84	0.318	0.202	0.228	0.276
	84	0.278	0.575	0.340	0.370
	80	0.337	0.335	0.793	0.755
	88	0.857	0.298	0.519	0.289
<i>Coeficiente de correlación</i>		<i>0.82</i>	<i>0.81</i>	<i>0.71</i>	<i>0.77</i>

*492 nm

Cuadro 13
RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE PARÁSITOS RECUPERADOS A LA
NECROPSIA CON LA ABSORBANCIA* DE ANTÍGENOS EN EL
SOBRENADANTE DE HECES DE OVINOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE

<i>Grupo</i>	<i>Parásitos</i>	<i>Semanas postinfección</i>		
		<i>4</i>	<i>8</i>	<i>12</i>
1	19	0.737	1.653	0.325
	12	0.312	1.033	0.345
	15	0.262	0.975	0.402
	11	0.757	0.710	0.485
	11	0.270	0.646	0.367
2	50	0.511	0.800	0.349
	56	0.859	1.06	0.658
	17	0.329	0.726	0.543
	29	0.457	2	0.907
	29	0.495	0.275	0.378
3	86	0.455	2	0.598
	84	0.392	0.508	0.68
	84	0.331	0.842	0.454
	80	0.443	0.686	0.722
	88	0.441	1.23	0.640
<i>Coefficiente</i>	<i>de correlación</i>	<i>0.63</i>	<i>0.56</i>	<i>0.76</i>

*492 ηm