



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD

Diagnóstico cuantitativo por coproantígenos
en bovinos con fasciolosis y desparasitados

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

KARINA HERNANDEZ GUZMAN

TUTOR

HECTOR QUIROZ ROMERO

COMITÉ TUTORAL

MARIA DOLORES CORREA BELTRAN
FROYLAN IBARRA VELARDE



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Parasitología por permitirme realizar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría y al proyecto PAPIIT IN 208703 por el financiamiento parcial para el proyecto.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero, por compartir con nosotros su sapiencia, la inquietud por conocer más y lo más importante, la amistad que me ha brindado.

A la Dra. Dolores Correa e Irene Cruz por su contribución con acertados comentarios para enriquecer el trabajo, además de la hermosa amistad que ha nacido.

Al Dr. Froylan Ibarra Velarde, Dr. Víctor Vázquez Prats, Dr. Fernando Alba Hurtado, por haber realizado la revisión crítica y las recomendaciones hacia el documento final.

A los Productos Farmacéuticos S. A. de C. V. Chinoin por proporcionarnos el fasciolicida utilizado en el presente trabajo, el financiamiento parcial del experimento y de las impresiones de la tesis.

A Perla Acevedo Ramírez, Belinda Ortiz Alegría, Claudia Rico Torres, Abel Zapata Arenas, Pedro Martínez por el valioso apoyo durante el trabajo de campo y laboratorio, además del afecto que estamos cultivando.

Al M.C. Guillermo Gómez Espinoza y al Ingeniero Agrónomo Agustín Gallegos Martínez por las facilidades otorgadas del estudio en Chapa de Mota.

A la familia Sandoval y Sánchez Miranda, propietarios del ganado bovino en el que se realizó el estudio, por habernos permitido utilizar sus animales para realizar nuestro estudio y al Sr. Agustín García Caballero por la ayuda que nos proporcionó en el manejo del ganado.

Al personal del Laboratorio de Bacteriología Experimental en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, en especial a Héctor Luna por su valiosa participación.

A la Dra. Guillermina Ávila y la Dra. Frida Salmerón por la asesoría en el trabajo de laboratorio y de estadística en la tesis.

A todas aquellas personas que de manera directa e indirecta colaboraron con el presente trabajo.

DEDICATORIA

Al Ser Supremo por la alegría de estar viva, y de poder disfrutar cada momento.

En especial a mis amados padres, **Alfredo Hernández Cruz** y **Sara Guzmán Gutiérrez** que me han enseñado el trabajo de la superación; a mis queridos hermanos **Luis Alfredo** y **Jorge Darío**, gracias a todos por darme las alas de libertad, el inmenso amor con que me arropan, la energía y valor que me inyectan a cada momento, asimismo, el apoyo incondicional que he recibido cuando emprendo una nueva aventura.

Pedro Molina Mendoza por los sueños que compartimos y estamos trabajando por hacerlos realidad, así como las palabras de ternura que me levantan cuando los momentos son difíciles.

Perla Acevedo Ramírez, porque sé que puedo confiar en ti, me has abierto las puertas de tu hogar y me has dado el regalo más hermoso: tu amistad.

A la Familia Mendoza Castillo, en especial al Ing. Víctor Manuel Mendoza Castillo por el apoyo material, y lo mejor, las palabras de aliento para continuar con el arduo camino.

A mis amigos, que me brindan palabras de apoyo, consejos y plegarias: Dr. Ocádiz, Elvirita, Familia Basañes Rojas, Jesús Bravo, Idalia, Fabiola, Zuil, Alma, Leo, Bely, Claus, M.C. Castañeda.

A todas las personas que han influido en mi formación personal y académica.

INDICE

AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
INDICE DE CUADRO	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Presentación del problema a investigar	1
1.2. Antecedentes sobre fasciolosis	2
1.2.1. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	2
1.2.2. Epidemiología de la fasciolosis	5
1.2.3. Impacto económico de la fasciolosis	5
1.3. Inmunología	6
1.3.1. Respuesta inmune en bovinos a la fasciolosis	6
1.3.2. Resistencia a la infección	8
1.3.3. Antígenos de <i>Fasciola hepatica</i>	9
1.4. Diagnóstico	11
1.5. Quimioterapia	14
1.6. Justificación de la investigación	17
1.7. Hipótesis de trabajo	18
1.7.1 Hipótesis específicas	18
1.8. Objetivo general	18

1.8.1. Objetivos específicos.....	18
2. MATERIALES Y METODOS.....	19
2.1. Localización.....	19
2.2. Animales.....	21
2.3. Diseño experimental.....	22
2.4. Toma de muestras.....	22
2.5. Procesamiento de las muestras.....	22
2.5.1. Procesamiento de las muestras de heces para ELISA.....	22
2.5.2. Estandarización del ensayo inmunoenzimático para la detección de antígenos de <i>F. hepática</i> en heces de bovino...	23
2.5.3. Obtención de antígenos de Excreción/Secreción de <i>F.</i> <i>hepática</i>	23
2.5.4. Obtención de suero policlonal anti- <i>F. hepática</i>	23
2.5.5. Obtención de IgG de conejo anti- <i>F. hepática</i>	24
2.5.6. Conjunción de IgG de conejo anti- <i>F. hepática</i> con peroxidasa.....	24
2.5.7. ELISA para detección de antígenos de <i>F. hepática</i> en bovinos con infección natural.....	25
2.5.8. Criterio para determinar la concentración de antígenos en heces.....	26
2.5.9. Técnica coprológica.....	27
2.6. Análisis estadístico.....	28
2.6.1. Concentración de coproantígenos.....	28
2.6.2. Datos coprológicos.....	29
3. RESULTADOS.....	31
3.1. Estandarización del ELISA para coproantígenos.....	31
3.2. Cinética de coproantígenos (CAg) de <i>F. hepática</i> en bovinos en los dos semestres de estudio.....	31
3.3. Efecto del closantel en la concentración de coproantígenos.....	33

3.4. Porcentaje de muestras positivas, media y rango de hpg de <i>F. hepatica</i>.....	36
3.5. Efecto intensivo y extensivo del closantel.....	42
3.6. Porcentaje de reducción de la media de hpg y de muestras positivas a <i>F. hepatica</i>.....	44
3.7. Correlación entre la variable coproantígenos y variable hpg.....	46
4. DISCUSIÓN.....	48
5. CONCLUSIONES.....	55
6. LITERATURA CITADA.....	56

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Técnicas utilizadas en el diagnóstico de <i>F. hepatica</i>.....	13
Cuadro 2. Porcentaje de muestras positivas, media y rango de hpg de <i>F. hepatica</i> en bovinos tratados con closantel, primer semestre de estudio.....	37
Cuadro 3. Porcentaje de muestras positivas, media y rango de hpg de <i>F. hepatica</i> en bovinos tratados con closantel, segundo semestre de estudio.....	39
Cuadro 4. Efecto intensivo y extensivo del closantel en bovinos infectados con <i>F. hepatica</i> en el primer semestre de estudio.....	43
Cuadro 5. Efecto intensivo y extensivo del closantel en bovinos infectados con <i>F. hepatica</i> en el segundo semestre de estudio.....	43
Cuadro 6. Porcentaje de reducción de la media de hpg y muestras positivas en bovinos con infección natural a <i>F. hepatica</i> en el primer semestre de estudio.....	45
Cuadro 7. Porcentaje de reducción de la media de hpg y muestras positivas en bovinos infectados con <i>F. hepatica</i> en el segundo semestre de estudio.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>.....	4
Figura 2. Estructuras químicas de los principales fasciolicidas.....	16
Figura 3. Temperatura y precipitación mensual del año 2004-2005 en Chapa de Mota, estado de México.....	20
Figura 4. Temperatura y precipitación mensual en San Miguel Topilejo, Tlalpan, D.F.....	20
Figura 5. Estandarización del inmunoensayo para coproantígenos a una concentración de 5 µg/mL en el primer anticuerpo.....	32
Figura 6. Estandarización del inmunoensayo para coproantígenos a una concentración de 10 µg/mL en el primer anticuerpo.....	32
Figura 7. Efecto del closantel en la concentración de coproantígenos de <i>F. hepatica</i> en bovinos con infección natural.....	35
Figura 8. Efecto del closantel en la excreción de huevos de <i>F. hepatica</i> en bovinos con infección natural.....	35
Figura 9. Cinética de coproantígenos de <i>F. hepatica</i> en bovinos con infección natural y tratados con closantel.....	41
Figura 10. Cinética de eliminación de huevos de <i>F. hepatica</i> en bovinos con infección natural y tratados con closantel.....	41

RESUMEN

Diagnóstico cuantitativo por coproantígenos en bovinos con fasciolosis y desparasitados.

El objetivo del trabajo fue diagnosticar cuantitativamente los coproantígenos de *F. hepatica* en bovinos tratados con diferentes dosis de closantel, en el periodo prepatente y patente de la infección, durante 13 meses. El estudio abarcó de julio de 2004 a julio del 2005; cada 28 días se realizó el muestreo de heces, el ELISA de captura y la técnica de sedimentación. Se calculó la concentración de antígenos en heces positivas a fasciolosis y se determinó un rango de 0.01 a 26 $\mu\text{g/mL}$. Al inicio del trabajo, la concentración promedio fue de $4.04 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$ y de 18.5 hpg, después de la segunda aplicación, la concentración de coproantígenos fue de 17.811 ± 2.62 y 0 huevos, después de la tercera aplicación la concentración de coproantígenos fue de $1.08 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ y 0 hpg. La dosis de closantel que presentó un mayor efecto en la cinética de excreción de huevos, fue de 7.5 mg/kg en julio y de 5 mg/kg en diciembre. En el primer semestre del estudio (julio-diciembre) se encontró una correlación positiva de 0.9428 ($p=0.0048$) entre la concentración de coproantígenos en heces y la cantidad de huevos, mientras que en el segundo semestre (enero-julio) no se observó correlación entre ambos parámetros. Bajo las condiciones de este experimento, se concluye que se logró diagnosticar cuantitativamente la fasciolosis en bovinos infectados, reinfectados de manera natural, y tratados con closantel durante los 13 meses de estudio.

Palabras clave: ***Fasciola hepatica*, ELISA, coproantígenos, diagnóstico cuantitativo, closantel.**

ABSTRACT

Quantitative coproantigen diagnosis for dewormed bovines infected with fasciolosis

The goal of this study was to make a quantitative coproantigen diagnosis of *F. hepatica* in bovines treated with different doses of closantel, in the prepatent and patent periods of the infection, during 13 months. The study was conducted between July 2004 and July 2005; the feces sampling, ELISA capture test and sedimentation technique were carried out every 28 days. The antigen concentration in feces positive to fasciolosis was calculated and a range of 0.01 to 26 µg/mL was determined. At the onset of the study, the average concentration was 4.04 ± 1.22 µg/mL and 18.5 epg. After the second application, the coproantigen concentration was 17.811 ± 2.62 and 0 eggs. After the third application, the coproantigen concentration was 1.08 ± 0.96 µg/mL and 0 epg. The dosis of closantel having the best effect to reduce faecal egg was 7.5 mg/Kg in July, whereas in December it was 5 mg/Kg. During the first semester of the study (July-December), a positive correlation of 0.9428 ($p=0.0048$) between the coproantigen concentration in feces and the quantity of eggs was found. During the second semester (January-July), no correlation between both parameters was observed. Under the conditions of this experiment, it can be concluded that it was possible to accomplish a quantitative fasciolosis diagnosis in bovines which were infected, reinfected naturally, and treated with closantel during the thirteen months of study.

Key words: *Fasciola hepatica*, ELISA, coproantigens, quantitative diagnosis, closantel.

1. INTRODUCCION

1.1. Presentación del problema a investigar

La fasciolosis es una de las enfermedades parasitarias más importantes dentro de los sistemas de producción pecuaria. Las pérdidas económicas abarcan desde el decomiso de hígados, canales de mala calidad, bajo rendimiento en producción de leche y/o carne, además de mayor susceptibilidad a otras enfermedades. En nuestro país, esta parasitosis se presenta en la mayor parte de los estados, con excepción de la región peninsular. Bajo estas circunstancias, necesitamos plantear esquemas de control sanitario, tomando en cuenta el tipo de explotación, datos meteorológicos del lugar, además de contar con técnicas de diagnóstico que nos permitan detectar la infección desde la fase temprana, pero que también permitan manipular grandes cantidades de muestras en poco tiempo. En base al diagnóstico oportuno, y la administración del tratamiento quimioterapéutico, es posible el control de la parasitosis, así como evitar la contaminación de más praderas, además de romper el ciclo biológico del trematodo. En este estudio, abordamos el tema de diagnóstico, utilizando un ELISA para coproantígenos; también se pretende evaluar la eficacia de diferentes dosis de un antiparasitario, medida a través de la presencia de huevos y la concentración de coproantígenos en diferentes tiempos, abarcando dos semestres de estudio, el primero de julio a diciembre del 2004, y el segundo de enero a julio del 2005.

1.2. Antecedentes sobre fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria, generalmente causada por el trematodo *Fasciola hepatica*. No obstante, existen otros trematodos, como *Fasciola gigantica*, que infectan mamíferos en algunas partes de África y Medio Oriente. *Fascioloides magna* infecta a ciervos y animales domésticos en América del norte. *Fasciola buski* parasita en cerdos y humanos en el Oriente. El trematodo más estudiado ha sido *F. hepatica* debido a su impacto en la salud de los animales domésticos y humanos¹. Se localiza principalmente en hígado y conductos biliares, aunque de forma errante, se ha encontrado en pulmones y útero. Afecta tanto a animales silvestres como domésticos: ovejas, cabras, vacas, gamos, asnos, caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres, castor, coipo, elefante, perros, gato, canguro y al ser humano.^{2, 3,4}

Este helminto hermafrodita tiene forma de hoja y es aplanado dorsoventralmente; llega a medir hasta 5 cm de largo por 1.5 cm de ancho. Posee dos ventosas (la ventral más grande que la oral), y un proceso cónico en su extremo anterior donde se encuentra la boca; son de color grisáceo, y la cutícula está cubierta de espinas dirigidas hacia atrás^{2,4}.

1.2.1. Ciclo biológico de *F. hepatica*

En el ciclo biológico de *F. hepatica*, los huevos pasan de la vesícula biliar al intestino y salen con las heces; en condiciones óptimas, a una temperatura de 26°C y un medio hídrico, eclosiona una larva ciliada llamada miracidio en 10 ó 12 días. El huevo, mide de 130-150 µm por 63-90 µm, no está embrionado cuando es eliminado, además debe estar limpio de heces, y el rompimiento debe ser en el lodo o en el agua para que el miracidio pueda nadar hasta un molusco de los

géneros *Lymnaea*, *Fossaria* o *Pseudosuccinea*, antes de las 24 horas, penetrar en él y continuar su desarrollo^{2,5}.

Durante el proceso de penetración al molusco, el miracidio pierde la cubierta ciliada y da lugar al esporocisto joven; el cual crece en el sistema digestivo del caracol y da origen a un gran número de redias, que posteriormente se trasladan al hepatopáncreas. A los 15 días existe una generación de redias, pero cuando las condiciones ambientales son desfavorables, (falta de humedad, temperaturas congelantes o muy elevadas) el molusco hiberna, entonces, el esporocisto puede formar dos o tres generaciones de redias hijas, que llegarán a la fase de cercarias⁵.

Las cercarias abandonan el hepatopáncreas, pasan al intestino posterior del caracol, y son expulsadas al exterior. Cuando las condiciones de temperatura y humedad son óptimas, el tiempo desde la penetración del miracidio hasta que es expulsada la cercaria, es de 5 semanas. La cercaria nada un par de horas hasta encontrar una superficie firme y se fija a las hierbas, plantas acuáticas, o debajo del nivel del agua, e inmediatamente pierde la cola, se enquista y se transforma en metacercaria⁵.

Para que la metacercaria pueda infectar a un huésped definitivo (vertebrado), debe transcurrir mínimo de 2 a 3 días después de haberse enquistado; los hospederos definitivos como los bovinos, los ovinos, los caballos, por mencionar sólo algunos, la ingieren con las plantas o en el agua. El proceso de desenquistamiento empieza en el rumen, con las condiciones adecuadas de alta temperatura (39 °C), concentraciones elevadas de dióxido de carbono, y un ambiente reductor; la emergencia de la adolecercaria de *F. hepatica* ocurre en el intestino, por estímulo de la bilis y del propio parásito. El trematodo recién desenquistado es capaz de penetrar la mucosa intestinal después de 1-2 horas y se puede encontrar en la cavidad abdominal después de 9 horas de

haber sido ingerida; el periodo errante en dicha cavidad es de 6 días, posteriormente atraviesa la cápsula hepática, para migrar al parénquima hepático. Aproximadamente a la semana 7 post-infección, penetra en los conductos biliares, después de 4 semanas alcanza la madurez sexual, y entre la semana 8 en ovinos, y 12 en bovinos, aparecen los primeros huevos en la bilis y después, en heces.^{2, 3,5}

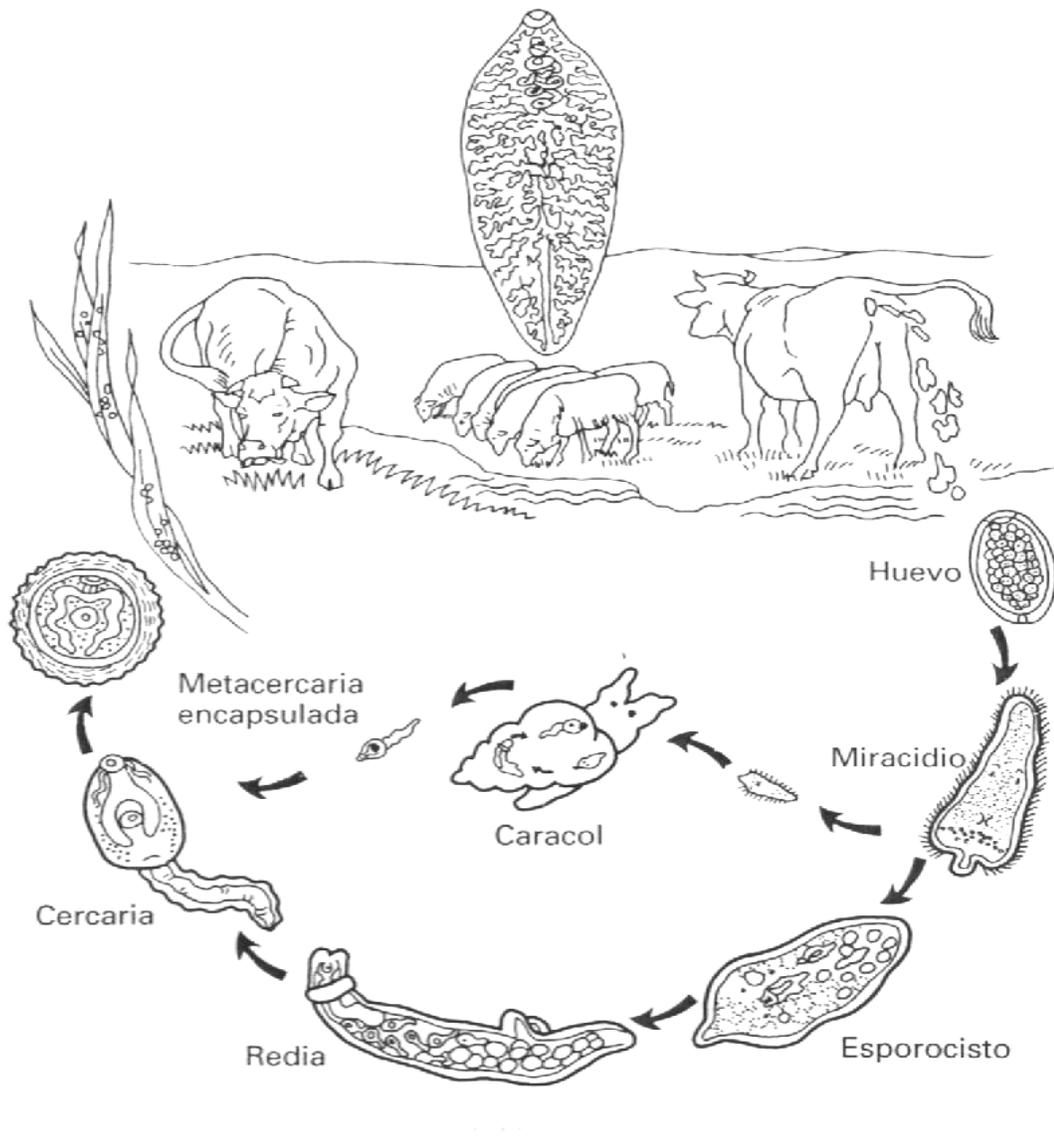


Figura 1. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*³

1.2.2. Epidemiología de la fasciolosis

La fasciolosis se presenta en regiones con climas templados, cálidos ó tropicales; desde el nivel del mar hasta cerca de los 3000 msnm. En animales que habitan tierras poco drenadas, alrededor de zanjas, diques en el campo, junto a los bebederos, filtración de fuentes y desagües, lugares húmedos, en agua lótica y léntica pero limpia; así como en suelos con pH ligeramente ácidos². Los estados con mayor prevalencia son Hidalgo, Tabasco, Estado de México, Michoacán y Veracruz (73-100%). Los estados que reportan de 31 a 70% de prevalencia son Guanajuato, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Jalisco, Durango, Aguascalientes, Oaxaca; mientras que los estados con el porcentaje más bajo (2 al 21.5%) son: Sonora, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí. No se reporta en los estados de Yucatán, Quintana Roo, parte de Campeche y Baja California Sur, que tienen suelos arenosos, que permiten la infiltración del agua, y suelos calcáreos que tienden a tener pH básico.⁴

1.2.3. Impacto económico de la fasciolosis

La fasciolosis provoca pérdidas económicas, las especies más afectadas en nuestro país son los bovinos y los ovinos⁴. Estas pérdidas se clasifican en directas e indirectas. La primera se relaciona con la mortalidad, debido a infecciones masivas en animales jóvenes, decomiso parcial y total de hígados; así como baja resistencia a otras enfermedades^{6,7}. Las pérdidas indirectas se clasifican en baja producción, mala calidad de la leche; baja tasa de crecimiento, mala conversión alimenticia, trastornos reproductivos y mala calidad de la canal. Genicot *et al.*,⁸ calcularon que un bovino pierde 23.5 Kg en 75 días, mientras que Ross⁹ menciona una disminución de la eficacia, en ganado productor de leche y carne del 8% en infecciones leves, y más del 20% en las graves, como consecuencia de ésta parasitosis. Castellanos *et al.*,¹⁰ determinaron la frecuencia de fasciolosis en bovinos sacrificados en las plantas

Tipo Inspección Federal (TIF) de

los años 1979-1987, el total de animales sacrificados en las 14 plantas TIF durante el período de estudio fue de 5,794,466 animales, mientras que el total de hígados decomisados fue de 424,009. El estado de Tabasco tuvo el mayor porcentaje de decomisos de hígado (86.69%), mientras que el porcentaje promedio general por estado y año fue de 7.31%. Posteriormente, Rangel *et al.*,⁶ estudio los datos de el Frigorífico y Empacadora de Tabasco S.A. de enero de 1988 a abril de 1989; de un total de 211,700 hígados de bovinos, fueron decomisados 41,701 hígados, lo que significó una pérdida de 250,206 kg, con un peso promedio de 6 kg/hígado y una prevalencia de 19.70%. En un análisis realizado por Encinas *et al.*,⁷ con la información del Rastro de Ferrería en la ciudad de México del año 1977 al 1987 reportaron, que el decomiso de hígado representó 5.19% del total de sacrificio, con un peso promedio de 7 kg/hígado, lo cual representó 763,889 kg. Por otra parte, Palacios¹¹, en Compostela Nayarit, determinó la prevalencia y calculó las pérdidas económicas en hígados decomisados en un período de enero a diciembre de 1997; encontró 85 bovinos positivos a *F. hepatica*, de un total de 1,657 animales sacrificados durante el año; la prevalencia anual fue de 5.1%, los más afectados fueron los bovinos adultos mayores de 36 meses de edad, y con respecto al sexo, las hembras fueron las más afectadas, por otra parte, el peso total de hígados decomisados en el rastro durante el período de estudio fue de 63,490 kg.

1.3. Inmunología

1.3.1. Respuesta inmune en bovinos a la fasciolosis

El sistema inmune defiende al cuerpo contra virus, bacterias, hongos, protozoarios, helmintos y otros agentes extraños. De esta forma, los mecanismos de defensa se dividen en: i) una rápida respuesta conocida como sistema inmune innato y ii) una lenta, específica y alta respuesta llamada sistema inmune adquirido¹. Hasta hace unos años, se pensaba que los mecanismos

del desarrollo y expresión inmune eran igual en todos los mamíferos; actualmente, algunos estudios comparativos han mostrado que el sistema inmune de varias especies es similar, pero no idéntico. Las principales diferencias se encontraron en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, diferenciación de leucocitos y la composición del sistema inmune¹².

En muchas infecciones se combinan la respuesta inflamatoria con la respuesta de anticuerpos, además se puede tener una gran variedad en los patrones de citocinas para tener una respuesta a Th1 o Th2¹³. El parásito interfiere con la fisiología del huésped, produciendo una serie de alteraciones que en conjunto conforman la enfermedad; por su parte, el huésped utiliza los mecanismos de la respuesta inmune para combatir al parásito. Dicha respuesta es el resultado de la compleja interdependencia de los procesos inmunológicos¹³. Cuando la metacercaria de *F. hepatica* penetra la pared intestinal de su hospedero, después de haber sido ingerida, y migra hacia el hígado por vía peritoneal, los macrófagos son reclutados por una activación alternativa (AAM ϕ) en la cavidad abdominal, antes de 24 horas pos-infección. El reclutamiento puede ser inducido por moléculas que son secretadas por el parásito, uno de los cuales ha sido identificado como un antioxidante tioredoxin peroxidasa (TPx). También se ha observado una elevada cantidad de antígenos del tegumento y glicócalix externo, que son podrían estar involucrados en la activación de macrófagos (respuesta a Th2)^{14,15}

En bovinos se encuentran las siguientes clase de anticuerpos: IgE, IgA, IgG e IgM y son capaces de mostrar una respuesta inmune protectora contra la infección¹⁶. Alcalá,¹⁷ menciona que de la 2da a la 3ra semana pos-infección (spi), aparece IgM y en menor grado IgG, de la 3ra a la 5ta spi empieza a aumentar la IgG, pero de la 5ta a la 6ta spi disminuye, posteriormente de la 7ma a la 12va spi, aumenta la IgG1 y aparece la IgA junto con los signos clínicos, aparecen linfocitos, nuevamente macrófagos, eosinófilos, células cebadas y

células plasmáticas, que están clasificadas como una respuesta inmune a los parásitos adultos. Ortiz *et al.*,¹⁸ observaron, que el ganado expuesto a infección natural desarrolla una respuesta significativa de IgG, y que la fluctuación de los anticuerpos en ganado adulto refleja la intensidad de la infección. En infecciones crónicas han encontrado que predomina el isotipo IgG1, mientras que la respuesta de IgG2 es muy baja o está ausente^{19,20}. La respuesta reguladora del isotipo IgG1, está determinada por la interleucina 4 (IL-4)^{19,21}, mientras que una respuesta a IgG2 se asocia a la producción de interferón gamma (IFN- γ)¹⁹. En bovinos con infección primaria, muestran una respuesta temprana de linfocitos, con una producción de IFN- γ en respuesta a los antígenos del parásito²² este grupo de investigadores plantean un funcionamiento dicotómico Th1/Th2, la detección de IFN- γ en etapas tempranas de la infección y su ausencia en la etapa crónica, pueden indicar una respuesta de polarización como progreso de la infección del parásito.

1.3.2 Resistencia a la infección

Muchas especies de mamíferos pueden ser infectadas por *F. hepatica*, pero existe variación en el grado de susceptibilidad a la infección, y la habilidad para adquirir resistencia. De acuerdo a esto, se han clasificado tres grupos:

1. Menor resistencia, presenta alta productividad parasitaria y una marcada patogenicidad, es el caso de borregos, ratones y lagomorfos.¹⁶
2. Resistencia moderada, tiene una reacción de retraso ante el proceso de implantación en el hígado, por ejemplo en humanos, bovinos, équidos, y ratas.^{3,16}
3. Mayor resistencia, existe una reacción rápida frente al parásito, evitando su desarrollo como en el cerdo, jabalí, perro, gato y cricetos.³

Existen otros factores, como la edad, por ejemplo las vaquillas son más susceptibles a la infección primaria que un animal adulto. Howell *et*

al.,¹ observaron que los animales desarrollan resistencia a las 12 semanas, después de una infección primaria, expresándose como una reacción de “autocuración”, expulsando parásitos 8 semanas más tarde; a las 18 – 26 semanas pos-infección se manifiesta resistencia a los estadios juveniles. Una característica definitiva de la patogénesis de esta infección es la elevación de citocinas Th2, como consecuencia de elevados niveles de prolina en suero y fibrosis en el hígado,¹⁵ junto con hiperplasia y calcificación de los ductos biliares²² como resultado, los trematodos disminuyen en tamaño.²³

1.3.3. Antígenos de *Fasciola hepatica*

El objetivo de estudiar los antígenos del parásito es para entender la respuesta inmune del huésped a la infección, obtener alguna molécula candidata para vacuna y obtener moléculas que sean útiles en el diagnóstico. Para éste fin, es necesario conocer los cambios por los que atraviesa el trematodo hasta llegar a su madurez. Durante el trayecto que hace el trematodo para llegar a los ductos biliares, sufre una serie de cambios morfológicos y fisiológicos, uno de los más importantes es el que ocurre en el tegumento y glicocalix. La fasciola recién desenquistada tiene sólo un tipo de células tegumentarias, Tipo 0, que secretan gránulos. Durante la migración hacia el hígado, las células Tipo 0 sufren una metamorfosis a células Tipo 1 y comienzan a secretar gránulos T1. Las células Tipo 2 de los adultos se originan de diferentes células embrionarias en el parénquima de 2 – 3 días pos-infección, pero no liberan los gránulos T2, sólo hasta que penetran los ductos biliares. Los gránulos T0 y T1 antigénicamente son similares, pero son diferentes antigénicamente con los gránulos T2. Se cree que la rapidez con que muda el trematodo, es una forma de evadir la respuesta inmune de su huésped.²⁴

El sistema digestivo también experimenta cambios durante la migración y maduración. Inicialmente, las células del tracto digestivo parecen

tener sólo la función de secretar, y morfológicamente son diferentes a las de los adultos. En los estadios recién desenquistados, sus células intestinales tienen pocas cantidades de gránulos secretores, aparato de Golgi Retículo Endoplásmico. Después de 24 horas pos-infección, cuando la *F. hepatica* se encuentra en la cavidad abdominal, las células cecales comienzan su función de absorción, aunque su función primaria es la secreción. Hasta que la adole-*F. hepatica* atraviesa la cápsula hepática, se puede observar el cambio morfológico de las células del intestino.²⁴

Los antígenos parasitarios pueden ser proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, lipo-proteínas, y lipo-polisacáridos.¹⁶ Milligen *et al.*,²⁵ identificaron antígenos de estadios recién desenquistados de 100, 65, 30 – 40, 14 y 12 kDa, y proponen a la proteína de 32 kDa para desarrollar una vacuna contra *F. hepatica*. Los estudios sobre antígenos de excreción/secreción en adultos, permitieron identificar los del contenido del intestino, células epiteliales del útero, del ducto excretor, así como células de la espermatogénesis, el primer grupo de antígenos tienen un peso molecular de 10-25 kDa y el segundo grupo de 100-500 kDa.²⁴ Sampaio *et al.*,²⁶ reconocieron antígenos de E/S en estadios adultos, dos moléculas, una de 25 y otra de 27 kDa, además de otras 3 moléculas de 12.4, 16.4 y 19.4 kDa reconocidas durante la fase aguda de la infección en humanos. El polipéptido de 27 kDa también es reportado por Irving *et al.*,²⁷ para *F. hepatica* juveniles. Otro grupo de moléculas de 37 -57 kDa y de 63 –116 kDa, fueron reconocidas en suero de pacientes con infección en fase aguda, pero presentaron reacción cruzada con otros parásitos.²⁶ Por otra parte, Rivera *et al.*,²⁸ identificaron componentes antigénicos en fasciolosis temprana con pesos de 150 -160 KDa.

Otros indicadores químicos en el plasma, de una fasciolosis aguda en bovinos, son la presencia de la actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la gamma-glutamil transferasa (γ GT). El incremento en

la actividad de GLDH indica severos daños en el parénquima del hígado, necrosis causada por la migración de estadios juveniles de *F. hepatica*,^{19,29} mientras que la actividad de γ GT refleja el daño celular de los ductos biliares al migrar los trematodos a través de ellos.¹⁹ Algunos otros antígenos que han mostrado tener un potencial inmunoproláctico contra la fasciolosis son la proteínas ligadas a ácido grasos (FABP), la glutatión S-transferasa (GST), las proteasas catepsinas L (catL), la aminopeptidasa de leucina (LAP), las saponinas (SAP2),³⁰ y algunas otras enzimas como la β -galactosidasa, la β -N-acetilhexosaminidasa y la β -glucosidasa.³¹

1.4. Diagnóstico

El método parasitológico tradicionalmente utilizado es el análisis coproparasitoscópico por sedimentación, que permite demostrar de manera directa la presencia de huevos del parásito cuando la infección está establecida. En bovinos al realizar solo un examen se tiene una sensibilidad del 70%, mientras que en ovinos es del 62 - 70%; al efectuar tres exámenes con la misma muestra, aumenta su sensibilidad a 93% en bovinos y 97% en ovinos³², pero se invierte más tiempo. Otras técnicas como el ultrasonido, la resonancia magnética y la tomografía computarizada, resultan poco prácticas en grandes animales; la biopsia tiene un costo elevado; mientras que la hipereosinofilia es poco precisa, ya que puede ser el resultado de una infección por nemátodos e incluso por ectoparásitos. En años recientes, los métodos serológicos se han implementado, debido a que permiten la detección temprana de la infección y la identificación de infecciones subclínicas, por su alta sensibilidad, además que permiten examinar una mayor cantidad de muestras en un lapso corto de tiempo (Cuadro 1). Entre las pruebas serológicas utilizadas se encuentran las siguientes:

- Reacciones de precipitación: doble inmunodifusión en gel de agar (DID) en

una o doble dimensiones, inmunolectroforesis (IE), contrainmunolectroforesis (CIE). La sensibilidad de estas técnicas es baja comparada con otras pruebas serológicas.³³

- Reacciones de aglutinación: aglutinación en látex (AL), floculación con bentonita (FB), hemoaglutinación indirecta o pasiva (HA).³³
- Fijación del complemento (FC), que suele presentar un número elevado de reacciones falsas positivas.³³
- Inmunofluorescencia: inmunofluorescencia indirecta (IFI), Prueba de anticuerpos fluorescentes con antígeno soluble (SAFA).³³
- Pruebas inmunoenzimáticas, para obtener una mayor sensibilidad y especificidad en la realización del ELISA, es recomendable utilizar antígenos de Excreción/Secreción (E/S) que tienen un menor número de componentes o son antígenos purificados. Otras modalidades del ELISA son Dot-ELISA o ELISA en mancha y Difusión en gel ELISA (DIG-ELISA) en las que las lecturas se realizan directamente en forma visual.^{16,33} Existe otro tipo de clasificación de los ELISA en función del reactivo marcado y de la finalidad para el que sea utilizado; si se tienen anticuerpos marcados, se encuentran ELISA Directo (D), Indirecto(I), doble sándwich de anticuerpos (DAS), indirecto doble sándwich de anticuerpos (IDAS). Si, se tienen antígenos marcados se tiene ELISA Competitivo (C).³⁴
- Western blot, por medio de ésta técnica se identifican moléculas que podrán ser utilizadas para realizar un diagnóstico preciso, o moléculas candidatas para vacunas.^{35,36}

Cuadro 1. Técnicas utilizadas en el diagnóstico de *F. hepatica*

TECNICA	ESPECIE	MUESTRA	S%	E%	AUTOR	
Intradermoreacción	Bovinos	Inoculación en el cuello	NR	NR	Lebrija <i>et al.</i> , ³⁷	
Ultrasonido, resonancia magnética y tomografía computarizada	Bovinos	-	NR	NR	Gonzalo-Orden <i>et al.</i> , ³⁸	
Biopsia	Ovinos	Hígado	NR	NR	Scherer <i>et al.</i> , ³⁹	
Hipereosinofilia	Humanos Caballos	-	NR	NR	Magnaval, ⁴⁰ Perler <i>et al.</i> , ⁴¹	
Aspiración de bilis	Bovinos	Bilis	98	NR	Braun <i>et al.</i> , ⁴²	
PCR	<i>Fossaria cubensis</i>	-	100	99.2	Kaplan <i>et al.</i> , ⁴³	
Sedimentación	Bovinos	Heces	33.3 ⁽¹⁾ 83.3 ⁽³⁾ 66.7 ⁽¹⁾ 68 ⁽¹⁾	NR NR 100 NR	Conceicao <i>et al.</i> , ⁴⁴ Conceicao <i>et al.</i> , ⁴⁴ Anderson <i>et al.</i> , ⁴⁵ Braun <i>et al.</i> , ⁴²	
ELISA	DOT	Bovinos	Ac en suero	82	90	Maisonnave ⁴⁶
	DIG	Bovinos	Ac en suero	97.5	80	Ibarra <i>et al.</i> , ⁴⁷
	Indirecta	Ovinos	Ag en suero	100	100	Mezo <i>et al.</i> , ⁴⁸
	Doble Ac	Ovinos	Ag en suero	86.6	100	Almazán <i>et al.</i> , ⁴⁹
	Sándwich	Ovinos	Ag en suero	86	100	Sánchez-Andrade <i>et al.</i> , ⁵⁰
	-	Equinos	Ag en suero	85.7	97.4	Vargas <i>et al.</i> , ⁵¹
	-	Humanos	Ag en suero	95	97	Silva <i>et al.</i> , ⁵²
	Doble Ac	Ovinos	Ag en heces	93.3	100	Almazán <i>et al.</i> , ⁴⁹
-	Bovinos	Ac en leche	95	98.2	Reichel <i>et al.</i> , ⁵³	
Western blot	Bovinos	Ag en suero	90	100	Gorman <i>et al.</i> , ³⁵	

(1) sólo una cuantificación de huevos

(3) cuantificación de huevo

NR, no reportado

1.5. Quimioterapia

Realizar un diagnóstico temprano, confiable y asociarlo a tratamiento quimioterapéutico, puede permitir controlar adecuadamente la fasciolosis. En la actualidad, el uso de fasciolicidas, es el método más práctico para su control. Es importante entender el modo de acción de los antihelmínticos, así como la forma de utilizarlos durante un brote de fasciolosis; además de realizar la medicación estratégica, para prevenir la enfermedad clínica, y por consecuencia reducir la producción de huevos de *F. hepática* e interrumpir el ciclo de vida del parásito.¹⁶

Inicialmente se utilizaron algunos productos naturales como el extracto de helecho⁵⁴ para el control de la fasciolosis. En la actualidad, los fasciolicidas más empleados se encuentran dentro de cinco grupos:

1. Fenoles halogenados (biotinol, niclofolan, nitroxinil), compuestos lipofílicos capaces de acarrear iones, particularmente K^+ y cruzar la membrana. Inhiben ciertas enzimas de la vía fosfoenolpiruvato a propionato⁵⁵. Afectan el sistema reproductivo, en especial los testículos.⁵⁶
2. Salicilanidas (closantel, oxiclozanide, rafoxanide), actúa como un desacoplador en la oxidación fosforilativa, estimulan el consumo de oxígeno, incrementan la respiración e incrementan la proporción oxaloacetato:malato, disminuyen la síntesis de ATP y el pH del tegumento, además bajan el potencial de membrana. Ocasionan daño en las células vitelinas, y afectan la espermatogénesis.^{55,56}
3. Bencimidazoles (triclabendazol, albendazol, mebendazol): tienen efecto en Fasciolas adultas e inmaduras, causan despolimerización de microtúbulos, inhibiendo la división mitótica durante la espermatogénesis. Afectan el tegumento, las células vitelinas y los testículos.^{55,56}
4. Sulfonamidas: (clorsulón), actúan en la glucólisis, vía principal de la fasciola para producir energía. Inhiben las enzimas glicolíticas 3-fosfogliceratasa, fosfogliceratomutasa y la

ruta de Emden-Meyerhoff, por lo cual se interrumpe la utilización de glucosa y formación de acetato propionato⁵⁵. Provocan una supresión gradual de la motilidad y daño en el tegumento.⁵⁶

5. Fenoxialcanos (diamfenetide), actúan mejor sobre formas inmaduras que en las formas maduras de *F. hepatica*. Causan cambios internos en los niveles iónicos e inducen una rápida parálisis flácida, provocan daños en el tegumento así como el intestino. La inhibición de la síntesis de proteínas, puede explicar el modo de acción de estos fasciolicidas, ya que las formas juveniles son más activas en la fase de crecimiento y diferenciación, por lo que requieren una mayor producción de cuerpos secretores en el tegumento y cambiar el glicócalix que les dará protección contra su hospedero en la fase adulta.⁵⁵ (figura 2).

El closantel, tiene una estructura química que consiste en un anillo ácido salicílico y un anillo anilido, junto con un grupo lipofílico. Es un compuesto, ácido débil (pKa= 4.28), pero es altamente liposoluble (log P= 7.15, n-octanol/amortiguador pH 6.98); tiene un peso molecular de 663.07 Da. Se encuentra principalmente en el plasma, y tiene una pobre distribución en los tejidos; es excretado principalmente en heces.⁵⁷ Tiene efecto fasciolicida contra estadios adultos y juveniles de 6-8 semanas de edad. No es efectivo en etapas inmaduras menores de 6 semanas⁵⁷. Su acción antihelmíntica es rápida, matando a los estadios adultos en 24 a 48 horas después de administrarlo⁵⁸. Tiene una vida media en el plasma de 14.5 días.⁵⁹ Debido a su efecto acidificante sobre el tegumento, afecta la motilidad, e interfiere con la síntesis de ATP;⁶⁰ al afectar el gradiente electroquímico de membranas del músculo y del tegumento, se pueden afectar otros fenómenos, por ejemplo, se menciona que actúa como agente desacoplante en la fosforilación oxidativa.⁶¹

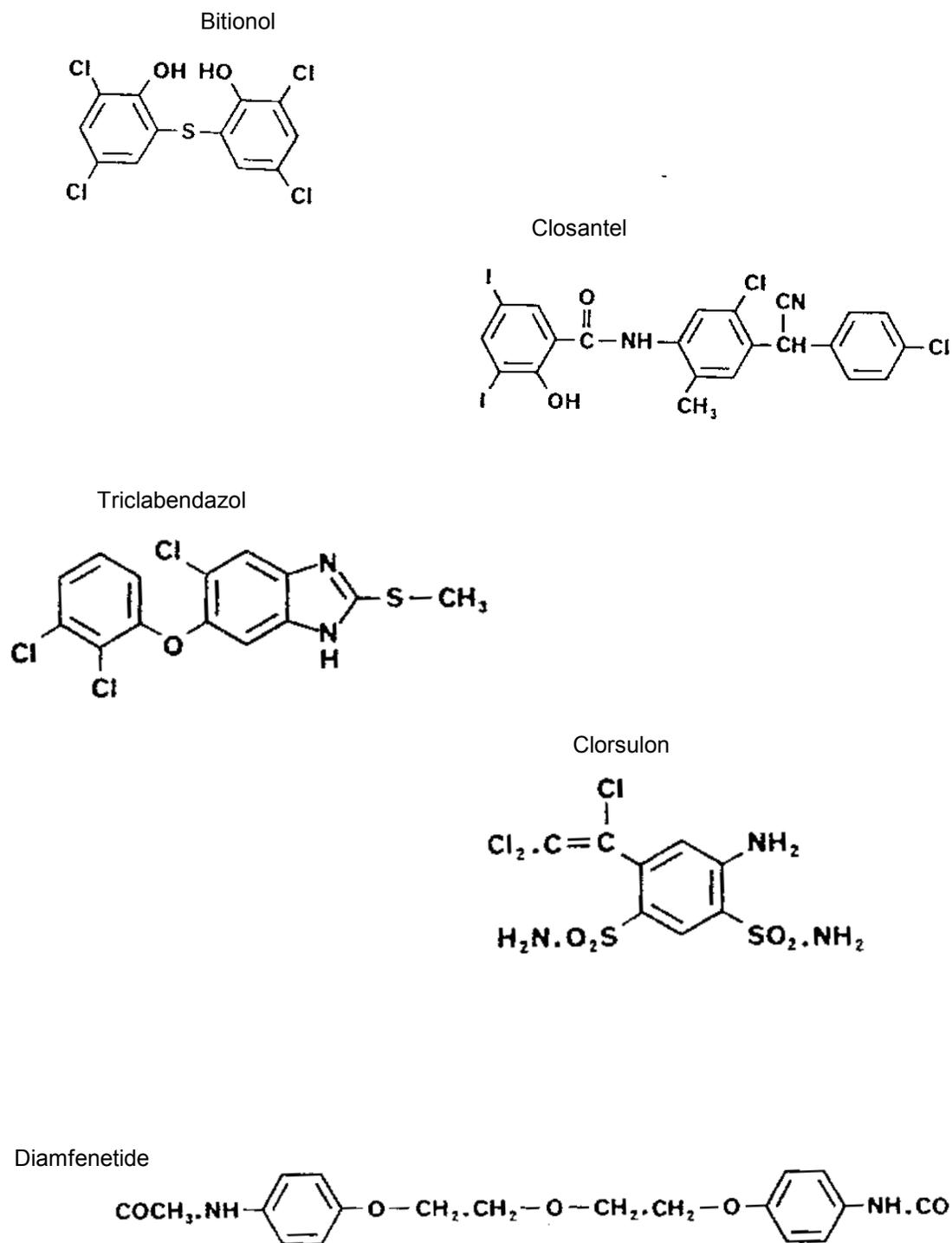


Figura 2. Estructuras químicas de los principales fasciolicidas.⁸⁸

1.6. Justificación

En la mayor parte de los estados de México, se puede encontrar el problema de fasciolosis en las explotaciones pecuarias. Como consecuencia, se tienen pérdidas económicas debido al decomiso de hígados, muerte de animales por una carga parasitaria elevada, así como el bajo rendimiento en producción de carne y leche. Es necesario disponer de técnicas de diagnóstico que sean rápidas, permitan manipular grandes cantidades de muestras, y que durante las tomas de muestras no estresen a los animales. El ELISA de captura para coproantígenos, tiene esas características, logra detectar la fasciolosis desde la etapa prepatente en bovinos que se encuentran en pastoreo, en una zona donde se ha encontrado una alta prevalencia en caracoles,⁶³ como lo es Chapa de Mota, estado de México. Una ventaja adicional de utilizar ésta técnica, es que probablemente nos permita monitorear el tratamiento quimioterapéutico, a través de la detección de la cinética de antígenos en heces, ya que cuando se realiza la evaluación a través de la técnica de sedimentación, sólo se diagnostica la etapa patente, mientras que con el inmunoensayo, se puede medir la presencia de los estadios que todavía no producen huevos, pero que ya se encuentran en los ductos biliares y son sensibles a la quimioterapia. Por otra parte, los estudios semestrales, permiten detectar los momentos de mayor riesgo de reinfección, y con base en éstos, plantear un esquema de control quimioterapéutico, con la dosis y vías de administración adecuadas para la región.

1.7. Hipótesis general

La cuantificación de coproantígenos permiten diagnosticar más del 90% de las muestras positivas a *F. hepatica* en el periodo prepatente y patente.

1.7.1. Hipótesis específicas

1. Las dosis altas de closantel, administradas por vía oral e intramuscular, reducen en mayor grado la concentración de coproantígenos y la cantidad de huevos en comparación a dosis menores en ganado con fasciolosis.

1.8. Objetivo general

Diagnosticar cuantitativamente los coproantígenos y los huevos de *F. hepatica* en bovinos, tratados con diferentes dosis de closantel, en el periodo prepatente y patente de la infección.

1.8.1. Objetivos específicos

1. Estandarizar el ELISA para coproantígenos para conocer la concentración de antígenos en heces de bovinos positivos a *F. hepatica*.
2. Diagnosticar mediante coproantígenos la fasciolosis en bovinos infectados y reinfectados de manera natural, así como desparasitados, en un tiempo de 13 meses.
3. Determinar el efecto del closantel en dos dosis y dos vías de administración en la concentración de coproantígenos y la cinética de excreción de huevos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Localización

Una parte del experimento se realizó en bovinos de un rancho situado en los alrededores del poblado de Chapa de Mota, Estado de México. El municipio se localiza al noroeste del Estado de México, sus coordenadas geográficas son 19° 43' 57" longitud oeste, 99° 25' 13" latitud norte. Se encuentra a una altitud de 2,750 metros sobre el nivel del mar. Tiene un clima que se clasifica como templado subhúmedo con lluvias en verano, presentando una temperatura promedio anual que oscila entre los 14.6°C⁶². En la figura 3, se puede apreciar la distribución de las lluvias y la temperatura.⁶³ Dicho rancho está situado en una zona de prevalencia alta de caracoles infectados por *F. hepatica*⁶⁴

La otra parte del experimento se realizó en bovinos pertenecientes al Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se encuentra en el kilómetro 28.5 de la carretera federal México – Cuernavaca, a 19° 08' 30" longitud oeste y 99° 12' 02" latitud norte, a una altura de 2,670 metros sobre el nivel del mar, el clima de la región corresponde a templado subhúmedo con lluvias en verano de mayor humedad, la temperatura promedio anual es de 11.4 °C y en la figura 4 se observa la distribución de la temperatura y precipitación a través del año.⁶⁵ Los animales de dicho centro están libres de *F. hepatica*.

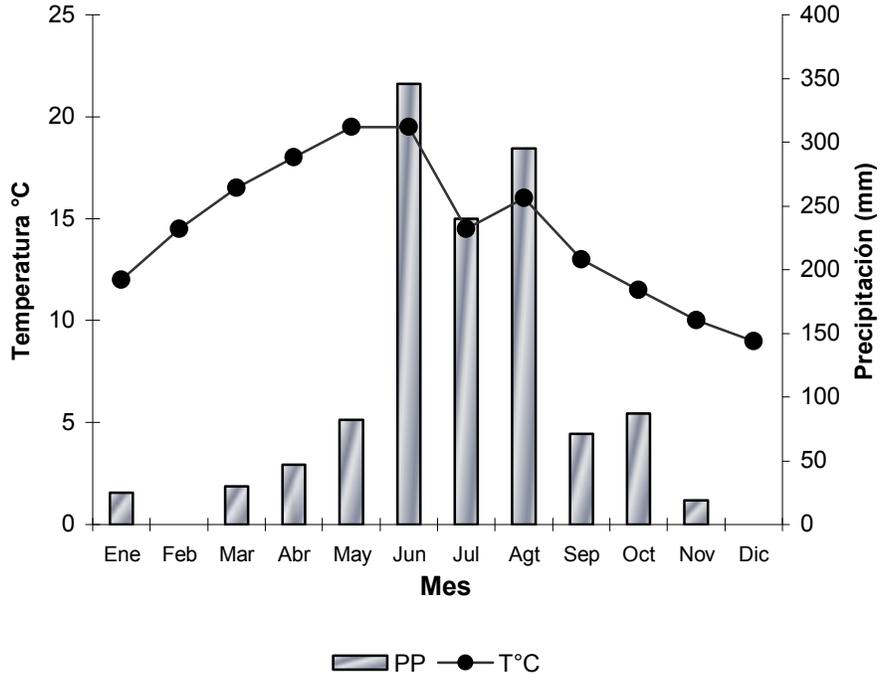


Figura 3. Temperatura y precipitación mensual del año 2004-2005 en Chapa de Mota, estado de México.⁶³

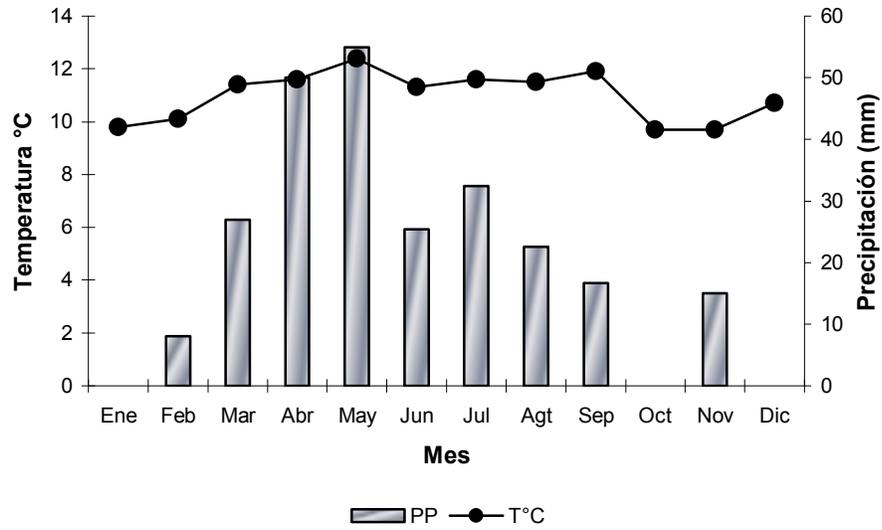


Figura 4. Temperatura y precipitación mensual, en San Miguel Topilejo, Tlalpan, D.F.⁶⁵

2.2. Animales

Se emplearon 49 cabezas de ganado vacuno localizados en un rancho de los alrededores de Chapa de Mota, hembras y machos adultos, cruce de razas europeas con cebú, con pesos que oscilaban entre 300 y 400 kg. El manejo zootécnico consistía en pastoreo extensivo diurno en praderas naturales, con acceso a fuentes de agua contaminadas con caracoles del género *Lymnea*. Por la noche eran sometidos a estabulación, donde les proporcionaban de 1 a 2 kg de concentrado y/o rastrojo de maíz con melaza. Algunas de las hembras se les ordeñaban, y no se les administraba periódicamente algún desparasitante. Previo examen coprológico, por la técnica de sedimentación⁶⁷, se diagnóstico la presencia de huevos de *F. hepática* con un rango de 1 a 105 huevos en 5 g de heces (hpg).

Por otra parte, se utilizaron las heces de 12 vacas de raza holstein, localizadas en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en Topilejo, D.F. Estos animales libres de *F. hepatica* se utilizaron para estandarizar el ELISA para coproantígenos. Su alimentación fue a base de concentrado con forraje de corte.

En el tratamiento quimioterapéutico, se administró *closantil 5%, solución inyectable subcutánea (closantel 50 mg) en 2 dosis, para el grupo 1, de 5 mg/kgPV, para el grupo 2 de 7.5 mg/kgPV, mientras que la presentación de *closantil 15%, solución oral (closantel 150 mg), fue para el grupo 3 de 10 mg/kgPV, y para el grupo 4 la dosis alta de 15 mg/kgPV.

***Closantil 5 % y Closantil 15% es marca registrada por Productos Farmacéuticos S.A. de C.V. Chinoin.**

2.3. Diseño experimental

El 24 de junio de 2004, 14 días antes de empezar el trabajo de investigación, se realizó un estudio coprológico para conocer la carga parasitaria. El día 8 de julio, se procedió a identificar a los animales por medio de un arete, para formar 4 grupos de 12 -13 animales cada uno, distribuidos de manera aleatoria.

La primera aplicación del closantel se realizó el día 1, la segunda administración fue en el día 155 y la tercera el día 334. La elección de las fechas para posteriores tratamientos, se decidió a partir de tener el 80% de muestras positivas a huevos del trematodo, se diagnosticaron por la técnica de sedimentación.⁶⁶

2.4. Toma de muestras

A partir del día 1, durante 13 meses, cada 28 días aproximadamente, se tomaron muestras de heces directamente del recto de cada uno de los animales. Las muestras se colectaron en bolsas de polietileno, y fueron transportadas en hielera con refrigerantes al laboratorio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. En el laboratorio, al momento de su llegada se mantuvieron en el congelador a -20°C, y al siguiente día se descongelaron las muestras para obtener el sobrenadante para el ELISA de captura, posteriormente se realizó la técnica de sedimentación.

2.5. Procesamiento de las muestras

2.5.1. Procesamiento de las muestras de heces para ELISA

Para obtener los antígenos, se colocaron 5 mL de la muestra fecal en 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con Tween-20 al 0.3% en un tubo cónico de 15 mL. Las heces se homogeneizaron en un vortex (Maxi Mix II) y se

centrifugaron a 4,135 g durante 20 min a 4°C (SIGMA 3K 15). Se obtuvo el sobrenadante en viales Eppendorf de 1.5 mL, se volvió a centrifugar a 7,992 g durante 20 min (Eppendorf 5415C) para obtener el sobrenadante, y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.5.2. Estandarización del ensayo inmunoenzimático para la detección de antígenos de *F hepatica* en heces de bovino

La estandarización del ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* se realizó de acuerdo al método descrito por Almazan *et al.*,⁶⁷. La detección de antígenos en heces se realizó por medio del ensayo de captura con doble cuerpo policlonal.⁶⁷

2.5.3. Obtención de antígenos de Excreción/Secreción (e/s) de *F. hepatica*

Se obtuvieron antígenos de e/s de parásitos adultos completos, de acuerdo al procedimiento señalado por Espino *et al.*,⁶⁸. Se disectaron 4 hígados de bovinos, obtenidos en el rastro municipal de Toluca, Estado de México. En el laboratorio, el mismo día se colectaron los trematodos, se lavaron 5 veces con PBS estéril con antibióticos concentrados (penicilina 50,000 UI/mL, estreptomina 500 µg/mL y gentamicina 500 µg/mL) hasta eliminar la sangre y quitar la contaminación fúngica y bacteriana. Posteriormente se pusieron en medio RPMI 1640, durante 24 h a 37°C. Se obtuvo el sobrenadante, y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford⁶⁹, usando un reactivo comercial de BIO-RAD. Se almacenó en fracciones a -20°C.

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

Para obtener anticuerpos anti-*F. hepatica*, se inmunizó con los antígenos de excreción-secreción, a una concentración de 2.49 mg/mL, a un conejo de raza

Nueva Zelanda de 1.5 Kg. de peso. El día 1 se le aplicaron 0.5 mL de antígeno de E/S *F. hepatica*, más 0.5 mL de PBS emulsionado con 1 mL de adyuvante completo de Freud por vía subcutánea; el día 15 se le aplicaron nuevamente, 0.5 mL de antígeno, más 0.5 mL de PBS emulsionado con 1 mL de adyuvante incompleto de Freud por vía subcutánea. Se realizaron otras inmunizaciones los días 29, 43, 56, 66, 78 y 87 con 0.25 mL del antígeno más 0.25 mL de PBS por vía intramuscular. Se realizó un ELISA para detección de anticuerpos anti-*F. hepatica* con las diferentes muestras de suero del conejo. El título de anticuerpos fue de 1:64,000 al día 78, y se aplicó una última inmunización el día 87. El día 97 se realizó el sangrado por punción cardiaca, se obtuvo la mayor cantidad de sangre posible, después de la coagulación, se obtuvo el suero por centrifugación; y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

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

La purificación de IgG del suero hiperinmune se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de Proteína A sefarosa CL4B (Sigma, Chem, Co.) de 1.5 x 2.5 cm. Antes de correr la columna se lavó y equilibró con PBS, 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 2.5. 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. La IgG se dializó durante 12 horas contra PBS a 4°C, se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford⁶⁹ y se almacenó en fracciones en el congelador a -20°C hasta su uso. Parte de la IgG obtenida se utilizó para el primer anticuerpo, otra parte se fijo a peroxidasa para utilizarlo como segundo anticuerpo.

2.5.6. Conjunción de IgG de conejo anti-*F. hepatica* con peroxidasa

Se disolvieron 4 mg de peroxidasa en 1 mL de agua destilada, se añadieron 0.2 mL de periodato de sodio 0.1 M y se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se dializó contra amortiguador acetato 1mM toda la noche a 4°C. Se adicionaron 20 µL de amortiguador de carbonato 0.2 M e inmediatamente 8 mg de la IgG de conejo anti-*F. hepatica*, que estaba en 1 mL de amortiguador de carbonato 0.01 M. Se agitó lentamente durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, se adicionaron 0.1 mL de solución fresca de borohidruro de sodio (4mg/mL) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se dializó nuevamente con PBS. Finalmente para calcular la RZ, se diluyó 1:10 el conjugado con PBS y se determinó la absorbancia a 405 y 280 nm contra blanco de PBS. $RZ = \text{absorbancia } 405 / \text{absorbancia } 280$, los valores deben quedar entre 0.3 y 0.5. Por último, se guardó en fracciones a -20°C.⁷⁰

2.5.7. ELISA para detección de antígenos de *F. hepatica* en bovinos con infección natural.

Para el acoplamiento del primer anticuerpo a un soporte sólido, se utilizaron placas de fondo plano de alta afinidad (Maxisorp, Nunc) de 96 pozos. Se colocó el primer anticuerpo diluido en solución de carbonatos (0.1M, pH 9.6); se pusieron en cada pozo 100 µL, a una concentración de 5 µg/mL. Se incubó 12 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados, entre cada lavado se colocó en el agitador 4 minutos. Las primeras 3 lavadas fueron con 200 µL de PBS-Tween al 0.05%, las 2 lavadas siguientes con 250 µL de PBS. Para bloquear la placa se agregaron 200 µL/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05% con leche descremada al 5%, y se incubó 30 minutos a 37°C. Después de hacer nuevos lavados, se añadieron 100 µL/pozo de los sobrenadantes de las muestras problemas, por duplicado. Se preparó una curva patrón de antígeno de *F. hepatica* diluido en una mezcla de muestras negativas. Las concentraciones de la curva fueron: 0 µg/mL, 0.01 µg/mL, 0.1

$\mu\text{g/mL}$, $1\mu\text{g/mL}$, $10\ \mu\text{g/mL}$ y $25\ \mu\text{g/mL}$; se incubó durante toda la noche a 4°C . Posterior a nuevas lavadas, se adicionó el segundo anticuerpo, IgG de conejo dirigido contra *F. hepatica* que se encuentra fijado a la peroxidasa, y se incubó durante hora y media a 37°C . Finalmente se lavó y adicionó la solución reveladora: 5 mL de ácido cítrico, 5 mL de citrato de sodio (amortiguadores); 0.004 g de O-fenilendiamina (cromógeno) y 10 μL peróxido de hidrógeno al 30% (sustrato), se adicionaron 100 μL /pozo y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad, hasta que se empezó a observar un color ámbar en la placa. La reacción se detuvo adicionando 50 μL /pozo de ácido sulfúrico 2N. Los valores de absorbancia se determinaron en un lector de ELISA Labsystems Multiskan MCC/340 a 492 nm.

2.5.8. Criterio para determinar la concentración de antígenos en heces

En la placa se tenían las muestras problema, las muestras negativas o control y la curva patrón, los pozos que correspondían a la concentración $0\ \mu\text{g/mL}$, fueron tomados como el “blanco”. Después de obtener las lecturas de absorbancia, se procedió a restar el promedio del “blanco” al resto de los valores de la placa, incluyendo la curva patrón. Posteriormente, los valores de concentración de la curva patrón se transformaron en logaritmo base 10 (Log_{10}) y se graficaron contra sus valores de absorbancia; se usaron los valores de placas con una $r^2 \geq 0.85$. Usando la fórmula de la recta ($y = mx + b$). Se interpolaron las absorbancias de las muestras y sus valores de “x” se transformaron a $\mu\text{g/mL}$ calculando su antilogaritmo. Así se calculó la concentración de antígenos. Aquellos valores que se encontraron fuera de la “recta”⁷¹, se consideraron arbitrariamente como $26\ \mu\text{g/mL}$ o $0.01\ \mu\text{g/mL}$ para los superiores e inferiores respectivamente.

2.5.9. Técnica coprológica

Para el estudio coprológico se empleó la técnica de sedimentación, se basa en la diferencia de peso específico del agua y el peso de los huevos, los cuales tienden a depositarse en el fondo del recipiente. Se colocaron 5g de heces, en un vaso, se agregó el agua y se mezcló hasta obtener una pasta uniforme, posteriormente se coló a un segundo vaso, a través de una coladera de malla fina. Se dejó reposar aproximadamente 10 minutos y después se decantó 2/3 partes del contenido del vaso y se aforó a 250 mL hasta que el sedimento estuvo limpio. Posteriormente, el sedimento se depositó en una caja de Petri cuadrículada, se agregó de 2 a 3 gotas de colorante azul de metilo, para contrastar el medio teñido, con los huevos que no se tiñen.⁶⁶ De los grupos formados, se tomaron los animales que fueron positivos por sedimentación para el cálculo de las variables enumeradas.

De los datos obtenidos en cada muestreo, se calculó:

1. Media de huevos por gramos (mhpg) \pm error estándar,
2. Rango de hpg (huevos por gramo),
3. Porcentaje de muestras positivas (%m+)⁷²
4. Efecto intensivo (%EI) del closantel, se calculó a la 12va semana pos-tratamiento⁷³
5. Efecto extensivo (%EE) del closantel, se calculó a la 12va semana pos-tratamiento⁷³
6. Porcentaje de reducción de la media de hpg vs muestreo 1 (%Rhpg vs M1)⁷⁴ donde M1 es el muestreo donde se aplicó el tratamiento.
7. Porcentaje de reducción de muestras positivas de bovinos vs muestreo 1 (%RM(+)) vs M1)⁷⁴, donde M1 es el muestreo donde se aplicó el tratamiento.

Estos parámetros permiten identificar cuál de los grupos tuvo el mejor comportamiento en la reducción de eliminación de huevos durante el estudio. Para

el EI y EE se siguió el lineamiento de la Asociación Mundial para los Avances de Parasitología Veterinaria (W.A.A.V.P.)^{75,76}

EI = media de hpg de las muestras positivas del día 1 – media de hpg en las muestras positivas en el siguiente muestreo ÷ media de hpg de las muestras positivas del día 1 x 100⁷³

EE = % muestras positivas del día 1 - % muestras positivas en el siguiente muestreo ÷ % muestras positivas del día 1 x 100⁷³

% Rm hpg = media de hpg del día 1 – media de hpg del Muestreo “n” (enésimo) ÷ media de hpg del día 1 x 100⁷⁴

% RM(+) = porcentaje de muestras positivas de bovinos del día 1 – porcentaje de muestras positivas del Muestreo “n” (enésimo) ÷ porcentaje de muestras positivas de día 1 x 100⁷⁴

2.6. Análisis estadístico

2.6.1. Concentración de coproantígenos

A la variable concentración de antígenos en heces se le realizó la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, y la prueba de la razón para la varianza⁷⁷ y se encontró una distribución normal. Posteriormente, los datos se analizaron a través de la prueba de mediciones repetidas a través del tiempo,^{78,79} para buscar diferencias entre las 4 dosis en cada muestreo; la primera parte abarcó del mes de julio a diciembre del 2004 (primer semestre), la segunda parte del análisis fue de enero a julio del 2005 (segundo semestre). Para buscar la diferencia entre temporadas se utilizó la prueba de efectos fijos.⁸⁰ Para observar la efectividad del closantel antes-después, se realizó la prueba comparación de muestras pareadas.⁸⁰ El día “antes” se refiere al día en que se aplicó el tratamiento y el “después”, a los 28 días después de aplicar el closantel. Los datos

fueron procesados utilizando el procedimiento MIXED del paquete “Statistical Analysis System” (SAS).⁸¹

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + d_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta

μ = Media general

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

d_{ik} = Error experimental aleatorio para vacas dentro del tratamiento con varianza dentro del tratamiento.

β_j = Efecto del j-ésimo tiempo.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre tratamiento y tiempo.

e_{ijk} = Error experimental aleatorio con $\sim N$ en las mediciones repetidas σ_e^2

2.6.2. Datos coprológicos

En el presente experimento, cada unidad experimental fue una vaca. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria a cada tratamiento. Para los análisis de la variable hpg, se realizó la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, y la prueba de la razón para la varianza.⁷⁷ No se encontró una distribución normal; en consecuencia, los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis⁷⁷ para buscar diferencia entre las 4 dosis en cada uno de los muestreos, la primera parte del estudio abarcó del mes de julio a diciembre del 2004 (primer semestre), la segunda parte del análisis fue de enero a julio del 2005 (segundo semestre). La prueba de Wilcoxon para dos muestras, se empleó para buscar diferencias entre las temporadas de estudio.⁸⁰ Se realizó un análisis estadístico para observar la efectividad del closantel antes-después, esto para comparar con la concentración de antígenos, se realizó mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.⁸⁰ El día “antes” se refiere al día en que se aplicó el

tratamiento y el “después”, a los 28 días después de aplicar el closantel. Los datos fueron procesados utilizando el programa “Statistical Analysis System” (SAS).⁸¹

Por último, se realizó la prueba para el coeficiente de correlación de Spearman⁸⁰ entre la variable concentración de antígenos en heces y la variable hpg, para los dos semestres de estudio.

3. RESULTADOS

3.1. Estandarización del ELISA para coproantígenos.

Para estandarizar el inmunoensayo, se probaron diferentes concentraciones del primer y segundo anticuerpo. Para el 1er anticuerpo, las concentraciones que se probaron fueron 5 y 10 µg/mL, mientras que para el 2do anticuerpo, se probaron las concentraciones 10, 25 y 50 µg/mL. Figura 5 y 6. Para el 1er anticuerpo, las lecturas de absorbancia fueron similares en las dos concentraciones, por lo que se utilizó la menor 5 µg/mL. En cuanto al 2do anticuerpo, se utilizó 50 µg/mL porque fue la que permitió observar mayor diferencia entre las muestras positivas y negativas.

3.2. Cinética de coproantígenos (CAg) de *F. hepatica* en bovinos en los dos semestres de estudio.

Para la variable CAg, no se encontró diferencia ($P>0.05$) entre los 4 grupos al inicio del experimento, que corresponde al primer semestre de estudio (julio-diciembre del 2004); donde la media en el Grupo 1, fue de 1.37 ± 0.72 µg/mL; en el Grupo 2, de 4.73 ± 0.0 µg/mL; en el Grupo 3, de 7.09 ± 3.30 µg/mL y en el Grupo 4, de 3.12 ± 2.38 µg/mL. Sin embargo, fue hasta el día 82 donde se encontró diferencia ($P<0.05$) entre el Grupo 2 con el resto de los grupos, no obstante la concentración fue de 25.81 ± 4.01 µg/mL, mientras que fue de 8.96 ± 3.1 µg/mL en el Grupo 1, 11.07 ± 0.07 µg/mL en el Grupo 3 y de 16.3 ± 2.8 µg/mL en el Grupo 4. El día 138, se observó diferencia ($P<0.05$) entre el Grupo 2 (4.05 ± 9.7 µg/mL) con el Grupo 3 (26.1 ± 4.9 µg/mL), mientras que la concentración fue de 18.1 ± 5.6 µg/mL en el Grupo 1 y de 18.5 ± 3.9 µg/mL en el Grupo 4. El día 155, momento en que se aplicó el segundo tratamiento, no se encontró diferencia ($P>0.05$) en la concentración de antígenos.

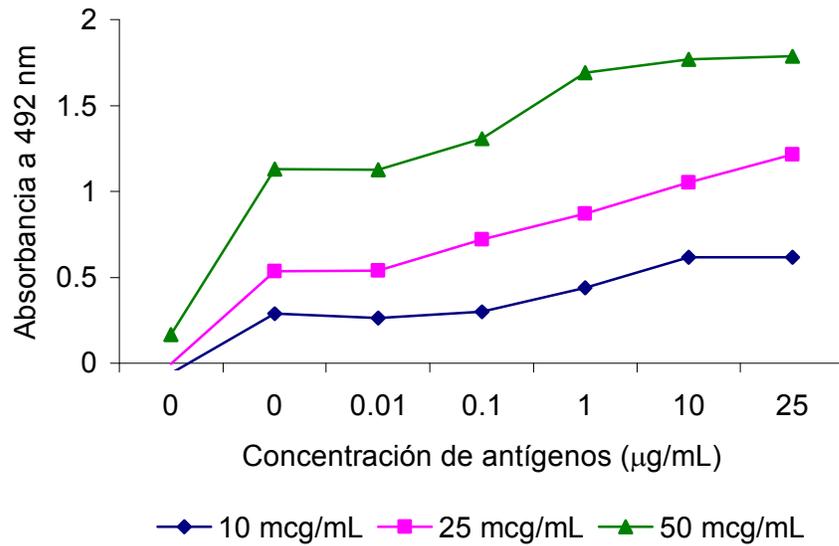


Figura 5. Estandarización del inmunoensayo para coproantígenos a una concentración de 5 µg/mL en el primer anticuerpo.

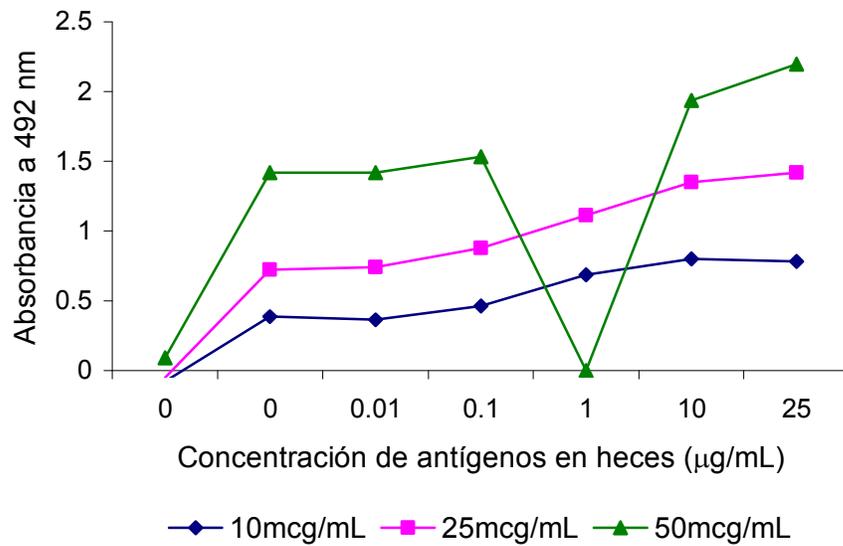


Figura 6. Estandarización del inmunoensayo para coproantígenos a una concentración de 10 µg/mL en el primer anticuerpo.

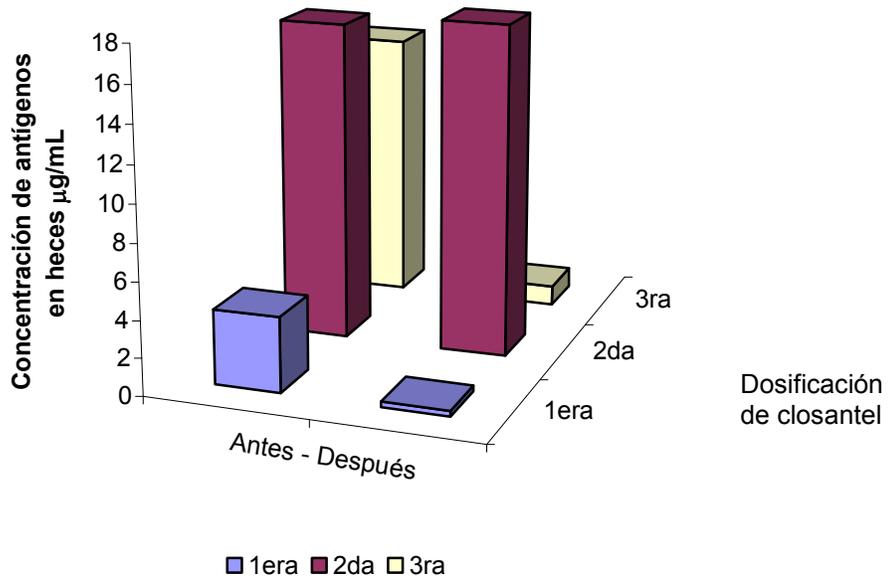
En el segundo semestre de estudio (enero-julio del 2005) no se encontró diferencia entre los grupos ($P>0.05$) después de aplicar el closantel. Sin embargo en el Grupo 1, la media fue de $15.4 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$; en el Grupo 2, de $24.7 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$; en el Grupo 3, de $19.3 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$ y en el Grupo 4, de $12.8 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$; no obstante se encontró diferencia ($P<0.05$) el día 222, aunque la concentración fue $4.5 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$ en el Grupo 1 y de $16.3 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$ en el Grupo 2; pero no se encontró diferencia entre el Grupos 3 ($8.2 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$) y Grupo 4 ($12.0 \pm 3.5 \mu\text{g/mL}$). Posteriormente, se encontró diferencia ($P<0.05$) entre el Grupo 1, con $9.2 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$; con el Grupo 2, con $23.1 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$. Más adelante se compara la cinética de los CAg con la cinética de hpg.

En la concentración de antígenos entre los dos semestres de estudio, se encontró diferencia ($P<0.05$), en el primer semestre se registró una concentración de antígenos de $10.8 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$, mientras que en el segundo semestre se detectó $7.5 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$.

3.3. Efecto del closantel en la concentración de coproantígenos.

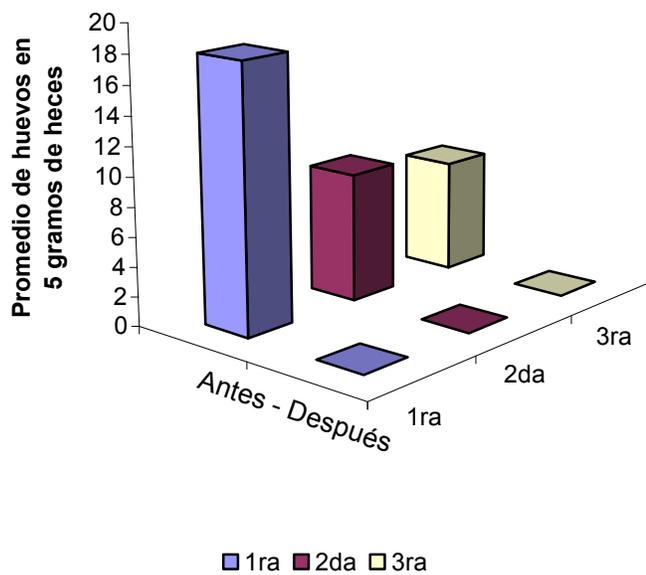
Antes del tratamiento la media de CAg fue de $4.04 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$, en el mes de julio, y 28 días después de la administración de closantel fue de $0.31 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$, con diferencias ($P<0.05$) entre los dos muestreos. En diciembre, antes de la segunda aplicación de closantel, el promedio de CAg fue de $17.22 \pm 1.71 \mu\text{g/mL}$, 29 días después de la segunda aplicación del fármaco se observó en $17.81 \pm 2.62 \mu\text{g/mL}$, no se encontró diferencias entre muestreos ($P>0.05$). Finalmente, en el mes de junio antes de la tercera dosificación, el promedio de CAg fue de $14.65 \pm 1.85 \mu\text{g/mL}$ y 28 días después fue de $1.09 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ en donde también se observó diferencias ($P<0.05$) entre ellos, Figura 7.

Al comparar el efecto del closantel en CAg y la variable hpg, se realizó un análisis estadístico comparando el día de la dosificación y 28 días pos-tratamiento, En las tres administraciones de closantel se encontraron diferencias ($P < 0.05$), como se puede observar en la figura 8. Antes de la primer aplicación de closantel, el día 1 (julio), el promedio de hpg fue de 18.02 ± 4.0 , y 28 días después fue de 0 hpg (agosto); en la segunda administración, día 155 (diciembre), el promedio fue de 8.80 ± 2.4 hpg antes de la dosificación (diciembre) y a los 29 días después fue de 0.6 hpg (enero); Por último se observó que antes de la tercera aplicación, el promedio fue de 7.68 ± 1.7 hpg (junio) y después de 28 días, de 0 hpg (julio).



Antes= día de aplicación del closantel, Después= 28 días pos-tratamiento

Figura 7. Efecto del closantel en la concentración de coproantígenos de *F. hepatica* en bovinos con infección natural.



Antes= día de aplicación del closantel, Después= 28 días pos-tratamiento

Figura 8. Efecto del closantel en la excreción de huevos de *F. hepatica* en bovinos con infección natural.

3.4. Porcentaje de muestras positivas, media, y rango de hpg de *F. hepatica*.

Primer semestre de estudio (julio-diciembre del 2004).

En el Grupo 1, el porcentaje de muestras positivas fue de 100% el día 1 (julio), posteriormente, osciló de 0% el día 28 (agosto), a 91.7% el 155 (diciembre). Sin embargo, la media de hpg, para éste mismo grupo, fue de 12.2 ± 5.0 el día 1 (julio), después cambió de 0 el día 28 (agosto) a 6.5 ± 1.8 el 155 (diciembre). El rango, de dicho grupo, fue de 1-62 en el día 1 (julio), no obstante osciló de 0 el día 28 (agosto) a 0-19 el 155 (diciembre), Cuadro 2.

En el Grupo 2, el porcentaje de muestras positivas fue de 100% el día 1 (julio), posteriormente varió de 0% el día 28 (agosto), a 87.5% el 155 (diciembre). Mientras que el promedio de hpg, fue de 29.2 ± 14.5 el día 1 (julio), después osciló de 0 el día 28 (agosto) a 3.5 ± 1.5 el día 155 (diciembre). Por último, el rango, cambió de 1-105 el día 1 (julio) a 0 el 28 (agosto) y de 0-12 el 112 (octubre), Cuadro 2.

En el Grupo 3, el porcentaje de muestras positivas fue de 100% el día 1 (julio), después osciló de 0% el día 28 (agosto), a 90% el 155 (diciembre). Sin embargo, el promedio de hpg, fue de 10.6 ± 3.3 el día 1 (julio), después varió de 0 el día 28 (agosto) a 8.1 ± 2.8 el 155 (diciembre). No obstante, el rango fue de 1-43 el día 1 (julio), a 0 el día 28 (agosto) y de 0-28 el día 155 (diciembre), Cuadro 2.

En el Grupo 4, el porcentaje de muestras positivas fue de 100% el día 1 (julio), posteriormente varió de 0% el 28 (agosto), a 72.7% el 138 (noviembre). Sin embargo, el promedio de hpg, fue de 22.9 ± 8.3 el día 1 (julio); después cambió de 0 el día 28 (agosto) a 20.4 ± 11.3 el 138 (noviembre). No obstante, el rango fue de

Cuadro 2. Porcentaje de muestras positivas, media y rango de hpg de *F. hepatica* en bovinos tratados con closantel, primer semestre de estudio.

		Primer semestre de estudio						
Parámetros estimados		08 Jul	05 Agt	02 Sep	28 Sep	26 Oct	23 Nov	10 Dic
		1 Tx	28	56	82	112	138	155 Tx
Grupo 1 Subcutánea. 5 mg/Kg	anim (+/ -)	12/ 0	0/ 12	1/ 11	3/ 8	9/ 3	8/ 4	11/ 1
	% m(+)	100	0	8.33	27.27	75	66.67	91.67
	media ± ee	12.2 ± 5.0	0	0.08 ± 0.1	0.64 ± 0.4	1.5 ± 0.3	2.17 ± 0.6	6.5 ± 1.8
	rango	1 – 62	0	0 - 1	0 - 3	0 – 3	0 – 6	0 - 19
Grupo 2 Subcutánea 7.5 mg/Kg	anim (+/ -)	8/ 0	0/ 8	0/ 8	1/ 6	3/ 5	5/ 3	7/ 1
	% m(+)	100	0	0	14.29	37.5	62.5	87.5
	media ± ee	29.25 ± 14.5	0	0	0.14 ± 0.1	1.75 ± 1.5	1.8 ± 1.0	3.50 ± 1.5
	rango	1 - 105	0	0	0 – 1	0 - 12	0 - 8	0 – 10
Grupo 3 Oral 10 mg/Kg	anim (+/ -)	10/ 0	0/ 10	0/ 10	6/ 4	6/ 4	6/ 4	9/ 1
	% m(+)	100	0	0	60	60	60	90
	media ± ee	10.60 ± 3.3	0	0	1.80 ± 1.3	5.30 ± 2.3	3.60 ± 1.9	8.10 ± 2.8
	rango	1 – 43	0	0	0 – 8	0 – 22	0 – 10	0 – 28
Grupo 4 Oral 15 mg/Kg	anim (+/ -)	11/ 0	0/ 11	1/ 10	5/ 6	6/ 5	8/ 3	8/ 3
	% m(+)	100	0	9.09	45.45	54.55	72.73	72.73
	media ± ee	22.91 ± 8.3	0	0.09 ± 0.1	0.91 ± 0.4	3.25 ± 1.7	20.45 ± 11.3	15.82 ± 8.3
	rango	1 – 96	0	0 - 1	0 - 4	0 - 17	0 - 121	0 – 95

anim (+/ -) = animales positivos a *F. hepatica* animales negativos a la infección. Diagnóstico por la técnica de sedimentación
 % m(+) = porcentaje de muestras positivas
 media ± ee = media ± error estándar

1-96 el día 1 (julio), posteriormente cambió de 0 el día 28 (agosto) a 0-121 el día 138 (noviembre). Cuadro 2.

En el segundo semestre de estudio (enero-julio 2005).

En el Grupo 1, el porcentaje de muestras positivas a huevos de *F. hepatica*, fue de 0% el día 186 (enero), posteriormente, osciló de 54.5% el día 250 (marzo) a 90.9% el 334 (junio). El promedio de hpg, fue de 0 el día 186 (enero), después varió a 8.1 ± 2.5 el 334 (junio). Mientras que el rango fue de 0 el día 186 (enero), posteriormente varió de 0-2 el día 250 (marzo) a 0-29 el 334 (junio), Cuadro 3.

En el Grupo 2, el porcentaje de muestras positivas a huevos de *F. hepatica*, fue de 0% el día 186 (enero), posteriormente cambió a 42.9% el día 250 (marzo), a 100% el día 334 (junio). No obstante, el promedio de hpg fue de 0 el día 186 (enero), después osciló de 1.4 ± 1.0 el día 250 (marzo) a 6.6 ± 1.8 el día 334 (junio). Sin embargo, el rango fue de 0 el día 186 (enero), luego varió de 0-7 el día 250 (marzo) a 0-14 el día 334 (junio), Cuadro 3.

En el Grupo 3, el porcentaje de muestras positivas a huevos de *F. hepatica*, fue de 10% el día 186 (enero), posteriormente varió de 90% el día 250 (marzo) a 100% el día 306 (mayo). Mientras que el promedio de hpg fue de 0.6 ± 0.6 el día 186 (enero), después osciló de 0.2 ± 0.2 el día 222 (febrero) a 10.9 ± 4.0 el día 306 (mayo). No obstante, el rango fue de 0-6 el día 186 (enero), posteriormente varió de 0-2 el día 222 (febrero) a 0-44 el día 306 (mayo), Cuadro 3.

En el Grupo 4, el porcentaje de muestras positivas a huevos de *F. hepatica*, fue de 0% el día 186 (enero), posteriormente varió de 20% el día 222 (febrero), a 100% el día 306 (mayo). Por otra parte, el promedio de hpg fue de 0 el día 186 (enero), después osciló de 0.5 ± 0.4 el día 222 (febrero) a 9.7 ± 3.7 el día 306 (mayo). No obstante, el rango fue de 0 el día 186 (enero), posteriormente cambió

Cuadro 3. Porcentaje de muestras positivas, media y rango de hpg de *F. hepatica* en bovinos tratados con closantel, segundo periodo de estudio.

		Segundo semestre de estudio						
Parámetros		18 Ene	15 Feb	12 Mar	12 Abr	11 May	07 Jun	05 Jul
Estimados		186	222	250	278	306	334 Tx	363
Grupo 1 Subcutánea. 5 mg/Kg	anim(+/-)	0/ 12	0/ 12	6/ 5	9/ 2	8/ 3	10/ 1	0/ 9
	% m(+)	0	0	54.55	81.82	80	90.9	0
	media ± ee	0	0	0.73 ± 0.2	2.64 ± 0.7	4.30 ± 1.2	8.09 ± 2.5	0
	rango	0	0	0 – 2	0 – 6	0 – 13	0 – 29	0
Grupo 2 Subcutánea 7.5 mg/Kg	anim(+/-)	0/ 8	0/ 8	3/ 4	4/ 4	5/ 2	8/ 0	0/ 7
	% m(+)	0	0	42.86	50	71.43	100	0
	media ± ee	0	0	1.43 ± 1.0	1.75 ± 0.8	3.43 ± 1.6	6.63 ± 1.8	0
	rango	0	0	0 – 7	0 – 5	0 – 9	0 – 14	0
Grupo 3 Oral 10 mg/Kg	anim(+/-)	1/ 9	1/ 9	9/ 1	8/ 2	10/ 0	6/ 3	0/ 8
	% m(+)	10	10	90	80	100	66.67	0
	media ± ee	0.60 ± 0.6	0.20 ± 0.2	2.40 ± 0.6	5.20 ± 1.6	10.90 ± 4.0	6.33 ± 3.3	0
	rango	0 – 6	0 – 2	0 – 6	0 – 16	0 – 44	0 – 31	0
Grupo 4 Oral 15 mg/Kg n= 11	anim(+/-)	0/ 10	2/ 8	8/ 2	9/ 1	10/ 0	7/ 3	0/ 7
	% m(+)	0	20	80	90	100	70	0
	media ± ee	0	0.50 ± 0.4	3.30 ± 1.5	6.70 ± 2.4	9.7 ± 3.7	9.30 ± 5.2	0
	rango	0	0 – 4	0 – 16	0 – 27	1 – 40	0 – 55	0

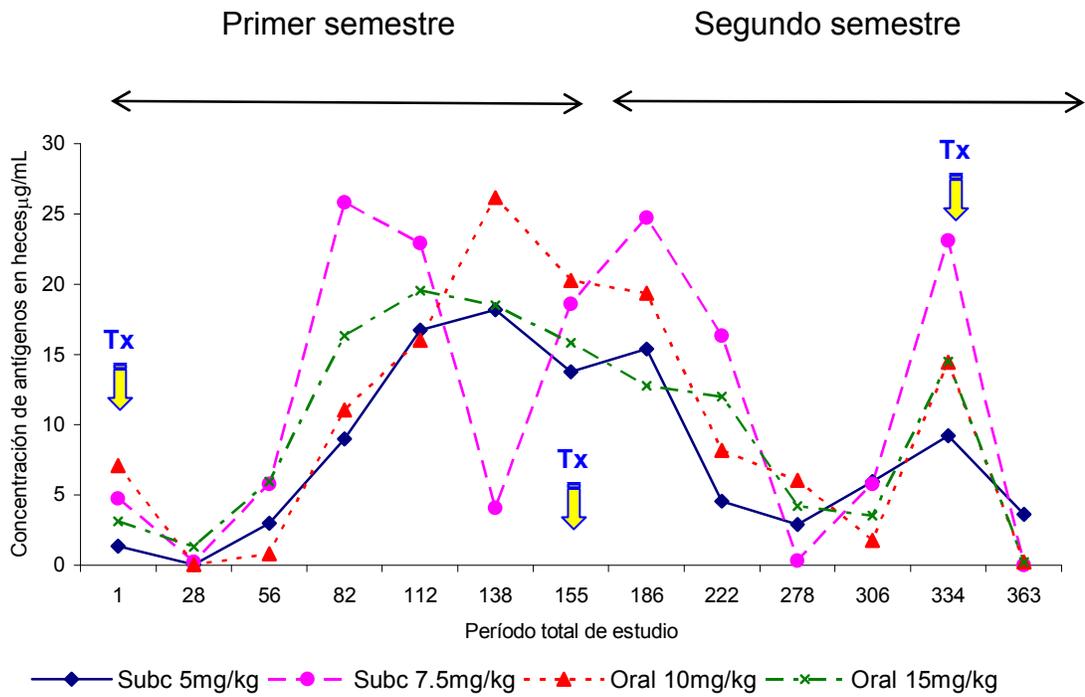
anim (+/ -) = animales positivos a *F. hepatica* animales negativos a la infección. Diagnóstico por la técnica de sedimentación

% m(+)= porcentaje de muestras positivas

media ± ee= media ± error estándar

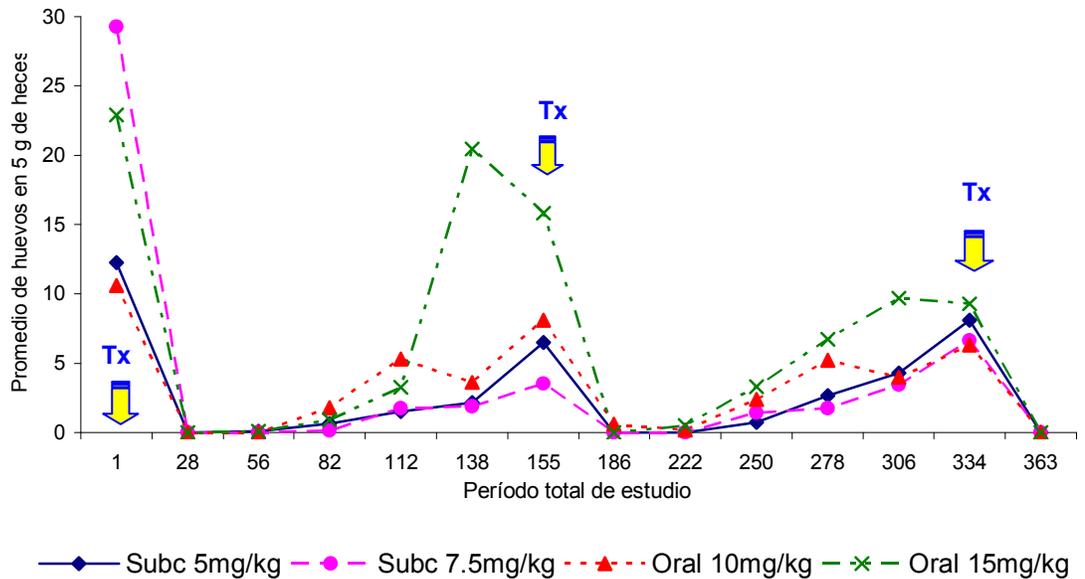
de 0-4 el día 222 (febrero) a 0-55 el día 334 (junio), Cuadro 3.

Al realizar el análisis estadístico de la variable media de hpg, no se encontró diferencia ($P>0.05$) entre los 4 grupos en cada uno de los muestreos realizados, tampoco se encontró diferencia ($P>0.05$) entre los dos semestres estudiados. En la figura 9 y 10, se aprecia la cinética de la concentración de CAg y de la excreción de huevos, así como el efecto del closantel en ambas variables.



Tx = día de aplicación de closantel **Subc= subcutánea**

Figura 9. Cinética de coproantígenos de *F. hepatica* en bovino con infección natural y tratados con closantel.



Tx = día de aplicación de closantel; **Subc= subcutánea**

Figura 10. Cinética de eliminación de huevos de *F. hepatica* en bovinos con infección natural y tratados con closantel.

3.5. Efecto Intensivo y Efecto Extensivo del closantel.

Primer semestre de estudio (julio-diciembre del 2004).

El promedio de hpg antes del tratamiento en los 4 grupos osciló de 10.6 (Grupo 3) a 29.2 (Grupo 2), sin que se encontrará diferencia estadística. En las semanas 4,8 y 12 después del tratamiento, dicho promedio de hpg varió de 0 a 1.8 entre los grupos. El efecto intensivo en la semana 12 varió de 83% en el Grupo 3 a 99.5% en el Grupo 2; mientras que los valores del efecto extensivo a la 12va semana, oscilaron entre 40% del Grupo 3 a 85.7% en el Grupo 2, Cuadro 4.

Segundo semestre de estudio (enero-julio del 2005).

Antes del tratamiento, la media de hpg en los 4 grupos varió de 3.5 (Grupo 2) a 15.8 (Grupo 4), sin que se encontrará diferencia estadística. En las semanas 4, 8 y 12 después del tratamiento, la media de hpg osciló de 0 a 3.3 entre los grupos. El efecto intensivo en la semana 12 fluctuaron de 60% en el Grupo 2, a 89.2% en el Grupo1; en cuanto al efecto extensivo, los valores oscilaron de -10% en el Grupo 4 a 51.01% en el Grupo 2. Cuadro 5.

Cuadro 4. Efecto intensivo y extensivo del closantel en bovinos infectados con *F. hepatica* en el primer semestre de estudio.

Grupo	Antes del Tx	Medias de hpg Semanas después del Tx			Efecto intensivo %	% animales excretando huevos antes/después del Tx	Efecto extensivo%
		4	8	12			
Grupo 1 Subcutánea 5mg/Kg	12.2	0	0.08	0.64	94.7	100/27.27	72.73
Grupo 2 Subcutánea 7.5 mg/Kg	29.2	0	0	0.14	99.5	100/14.29	85.7
Grupo 3 Oral 10 mg/kg	10.6	0	0	1.80	83.0	100/60	40
Grupo 4 Oral 15 mg/Kg	22.9	0	0.09	0.91	96.0	100/45.45	54.55

Tx= tratamientos con closantel

Cuadro 5. Efecto intensivo y extensivo del closantel en bovinos infectados con *F. hepatica* en el segundo semestre de estudio.

Grupo	Antes del Tx	Medias de hpg Semanas después del Tx			Efecto Intensivo %	% animales excretando huevos antes/después del Tx	Efecto Extensivo%
		4	8	12			
Grupo 1 Subcutánea 5mg/Kg	6.5	0	0	0.7	89.2	91.7/54.5	37.2
Grupo 2 Subcutánea 7.5 mg/Kg	3.5	0	0	1.4	60	87.5/42.9	51
Grupo 3 Oral 10 mg/kg	8.1	0.6	0.2	2.4	70.4	90/90	0
Grupo 4 Oral 15 mg/Kg	15.8	0	0.5	3.3	79.1	72.7/80	-10

Tx= tratamientos con closantel

3.6. Porcentaje de reducción de la media de hpg y de muestras positivas a *F. hepatica*.

Primer semestre de estudio, (julio-diciembre del 2004).

En el Grupo 1, los porcentajes de reducción de la media de hpg oscilaron de 94.8% el día 82, a 46.9% el día 155. Por otra parte, el porcentaje de reducción de muestras positivas varió de 72.7% el día 82 a 8.33% el día 155, Cuadro 6.

En el Grupo 2, el porcentaje de reducción de la media de hpg cambió de 99.51% el día 82 a 88.03% el día 155; mientras que el porcentaje de reducción de muestras positivas osciló de 85.7% el día 82 a 12.5% el día 155, Cuadro 6.

Para el Grupo 3, los valores del porcentaje de reducción de la media de hpg variaron de 83.02% el día 82, a 23.5% el día 155. Sin embargo, el porcentaje de reducción de las muestras positivas, cambió de 40% el día 82 a 10% el día 155, Cuadro 6.

En el Grupo 4, el porcentaje de reducción de la media de hpg, osciló de 96.03% el día 82 a 10.71% en el día 138. Los valores del porcentaje de reducción de muestras positivas varió de 54.5% el día 82 a 27.27% el día 138, Cuadro 6.

Segundo semestre de estudio (enero-julio de 2005).

El porcentaje de reducción de la media de hpg, en el Grupo 1 fue de 100% el día 186, posteriormente cambió a -24% el día 334. No obstante, el porcentaje de reducción de muestras positivas osciló de 100% el día 186, a 0.83% el día 334, Cuadro 7.

Cuadro 6. Porcentaje de reducción de la media de hpg y de muestras positivas a hpg en bovinos infectados con *F. hepatica*, en el primer semestre de estudio.

		Primer periodo de estudio			
Parámetros		28 Sep	26 Oct	23 Nov	10 Dic
		82	112	138	155 Tx
Grupo 1 Subcutánea 5 mg/Kg	%rmhpg	94.81	87.76	82.31	46.94
	%rm(+)	75	25	33.33	8.33
Grupo 2 Subcutánea 7.5 mg/Kg	%rmhpg	99.51	94.02	93.59	88.03
	%rm(+)	85.71	62.5	37.5	12.5
Grupo 3 Oral 10 mg/Kg	%rmhpg	83.02	50	66.04	23.58
	%rm(+)	40	40	40	10
Grupo 4 Oral 15 mg/Kg	%rmhpg	96.03	84.52	10.71	30.95
	%rm(+)	54.55	45.45	27.27	27.27

%rmhpg= porcentaje de reducción de la media de hpg
 %rm(+)= porcentaje de reducción de muestras positivas
 Tx= tratamientos con closantel

En el Grupo 2, el porcentaje de reducción de la media de hpg fue de 100% el día 186, luego varió a -89% el día 334; por otra parte, el porcentaje de reducción de muestras positivas osciló de 100% el día 186 a -14% el día 334, Cuadro 7.

En el grupo 3 el porcentaje de reducción de la media de hpg varió de 92.59% el día 186 a -34.57% el día 306; sin embargo, los porcentajes de reducción de muestras positivas, oscilaron de 88.89% el día 186 a -11.11% el día 334, Cuadro 7.

Para el Grupo 4, los porcentajes de reducción de la media de hpg cambiaron de 100% el día 186 a 38.68% el día 306, por otra parte, dichos porcentajes de reducción de muestras positivas cambiaron de 100% el día 186 a -37.5% el día 306, Cuadro 7.

3.7. Correlación entre la variable coproantigenos y variable hpg.

En el primer semestre (julio-diciembre del 2004), se encontró una correlación positiva de 0.9428 ($P=0.0048$) entre la cantidad de antígenos en heces y la cantidad de huevos de *F. hepatica*; mientras que en el segundo semestre (enero-julio del 2005), no se encontró dicha correlación entre ambos parámetros - 0.300 ($P=0.6238$)

Cuadro 7. Porcentaje de reducción de la media de hpg y de muestras positivas a hpg en bovinos infectados con *F. hepatica* en el segundo semestre.

		Segundo periodo de estudio						
		18 Ene	15 Feb	12 Mar	12 Abr	11 May	07 Jun	05 Jul
Parámetro		186	222	250	278	306	334 Tx	363
Grupo 1 Subcut. 5 mg/Kg	%rmhpg	100	100	89	59	34	-24	100
	%rm(+)	100	100	40.5	10.74	12.73	0.83	100
Grupo 2 Subcut. 7.5 mg/K	%rmhpg	100	100	59	50	2	-89	100
	%rm(+)	100	100	51	43	18	-14	100
Grupo 3 Oral 10 mg/Kg	%rmhpg	92.59	97.53	70.37	35.80	-34.57	21.81	100
	%rm(+)	88.89	88.89	0	11.11	0	-11.11	100
Grupo 4 Oral 15 mg/Kg	%rmhpg	100	96.84	79.14	57.64	38.68	41.21	100
	%rm(+)	100	72.5	-10	-23.75	-37.5	3.75	100

Subct.= subcutánea

%rmhpg= porcentaje de reducción de la media de hpg

%rm(+)= porcentaje de reducción de muestras positivas

Tx= tratamientos con closantel

4. DISCUSION

Tradicionalmente se ha utilizado la técnica de sedimentación para diagnosticar la infección de *F. hepatica* en bovinos y otras especies, de esta forma, sólo es posible diagnosticar la infección en el periodo patente. Algunos investigadores (Boulard *et al.*,⁸² Molloy *et al.*,⁸³) han medido los niveles de anticuerpos en suero, siendo de gran utilidad en estudios epidemiológicos, sin embargo, la desventaja es que los anticuerpos están presentes algunos meses después que el animal ha sido desparasitado, por lo que este método no es capaz de medir los sucesos quimioterapéuticos. En el presente trabajo, se realizó el diagnóstico por coproantígenos (CAg), el ELISA de captura, fue capaz de detectar la infección durante los 14 muestreos, en todos los bovinos estudiados. Además fue posible cuantificar los coproantígenos, de esta manera se observaron los sucesos quimioterapéuticos a través del tiempo.

ELISA de captura para coproantígenos

El inmunoensayo detectó CAg desde la cuarta semana pos-tratamiento, como en el trabajo realizado por Paz-Silva *et al.*,⁸⁴ sin embargo, difiere del de Abdel-Rahman *et al.*,⁸⁵ pues a pesar de que trabajaron con bovinos, detectaron los CAg hasta la sexta semana pos-infección, además de que la infección fue experimental. En España, Mezo *et al.*,⁸⁶ diagnosticaron los CAg en la quinta semana pos-infección en corderos infectados experimentalmente, mediante un anticuerpo monoclonal con un ELISA de captura. El diagnóstico de CAg de *F. hepatica*, en bovinos fue posible debido a que se detectaron productos metabólicos de parásitos localizados en los ductos biliares, los cuales al ser liberados, salen a través de las heces⁸⁷. En este estudio, se detectó CAg desde la cuarta semana después de haber desparasitado, por lo que se interpreta que son CAg de los parásitos que no fueron eliminados por el desparasitante, ya que el closantel solo extermina a las fasciolas de 6 semanas de edad en adelante,^{88,89} y

los CAg son de fasciolas que han llegado a los ductos biliares, pero que aún no comienzan a producir huevos.

En cuanto a las concentraciones de coproantígenos, en el presente estudio, la cantidad máxima que se logró estimar fue de 26 $\mu\text{g/mL}$ mientras que la mínima fue de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (10ng/mL), situación que concuerda con los resultados de Duménigo *et al.*,⁹⁰ quienes reportaron una concentración >12 ng/mL, por encima del cual consideraron toda muestra de ovino estudiada como positiva. En otro estudio realizado por Duménigo *et al.*,⁹¹ detectaron de 13 a >100 ng/mL en sobrenadantes de heces de bovinos en el rastro. Por su parte, Mezo *et al.*,⁸⁶ tomaron muestras de heces en bovinos en el rastro, ellos reportan una concentración de CAg de 0.805 a 199.8 ng/mL, utilizaron un ELISA de captura con un anticuerpo monoclonal (MM3). Abdel-Rahman *et al.*,⁸⁵ mencionaron que a través del ELISA de captura con un anticuerpo monoclonal lograron detectar 300 pg/mL en los sobrenadantes fecales de vaquillas. En nuestro estudio, aún después de aplicar el closantel, así como en cada muestreo realizado en los 13 meses, siempre se registraron concentraciones de coproantígenos. En consecuencia, el ELISA de captura con un anticuerpo policlonal resultó ser una buena herramienta, no sólo de diagnóstico, también, nos permitió evaluar el antiparasitario en todo momento, y al conocer éstos factores, es posible proponer calendarios de desparasitación estratégicos.

Efecto del closantel en la concentración de CAg y hpg

De manera resumida, al observar las gráficas de barras, se puede apreciar el efecto del closantel en la variable CAg y hpg a los 28 días postratamientos. Después de la primera dosificación, el closantel fue eficaz, la concentración de CAg y en la reducción de hpg, después de la segunda aplicación del tratamiento, no se logró apreciar un descenso de la concentración CAg, pero se observó una reducción en hpg. En la tercera aplicación del closantel se observó el mismo fenómeno que en la primera aplicación. El efecto del closantel se ha relacionado

directamente con las concentraciones plasmáticas del medicamento, y en menor grado, con las concentraciones plasmáticas residuales; aunque las larvas no se mueren en su totalidad, son seriamente dañadas, no sólo por el tratamiento, sino también por los niveles plasmáticos residuales del fármaco⁵⁸; al tomar en cuenta lo expuesto anteriormente, y relacionarlo con los factores climáticos, se deduce que esta diferencia en los resultados es en parte debida a la disparidad entre las temporadas; mayor carga parasitaria, como consecuencia de una mayor ingesta de forraje con metacercarias en la temporada de lluvias, y una menor carga en la temporada de sequía, como resultado de menor disponibilidad de alimento⁹²; además de que pueda existir un efecto estacional en la fasciolosis, como lo plantean Bouvry *et al.*,⁹² y Phiri *et al.*,⁹³.

Efecto intensivo y extensivo

En base a la escala de valores del efecto intensivo y extensivo, propuesta por la Asociación Mundial para los Avances de Parasitología Veterinaria^{75,76} se observaron los siguientes resultados de la variable hpg: en el mes de julio (día 1) fue altamente efectivo en el Grupo 2 (subcutánea 7.5 mg/kg), de efectivo en el Grupo 1 (subcutánea 5 mg/kg) y el Grupo 4 (oral 15 mg/Kg), finalmente el efecto fue moderado en el Grupo 3 (oral 10 mg/Kg). Estos resultados en general, concuerdan con los resultado obtenidos por Cerrud *et al.*,⁹⁴ Mage *et al.*,⁹⁵ e Ibarra *et al.*,⁹⁶; sin embargo, el efecto intensivo en la segunda aplicación (día 155) fue insuficiente (< 80%) en los Grupos 2, 3 y 4; solamente el Grupo 1 presentó un efecto moderado. En lo que se refiere al efecto extensivo, en la primera aplicación (día 1) del closantel, solamente el Grupo 2 presentó un efecto moderado, el resto de los grupos tuvo un efecto insuficiente; después de la segunda administración (día 155) del antiparasitario, el efecto en los 4 grupos fue insuficiente, lo cual coincide con Cerrud *et al.*,⁹⁴ Ibarra *et al.*,⁹⁶ Ibarra *et al.*,⁹⁷. La farmacocinética intramuscular descrita para closantel, presenta al inicio un coeficiente rápido de distribución, seguido de un coeficiente lento de eliminación, mientras que en la

absorción oral de closantel, la persistencia de este compuesto en el cuerpo, se debe principalmente a la recirculación a través del tracto gastro-retículo, así como de la recirculación en la secreción de saliva. Ambas vías de administración dependen de la dosis y se ha observado un incremento lineal de closantel en el plasma.⁹⁸ Por lo anteriormente expuesto, además de los datos obtenidos, se deduce que la administración del closantel por vía subcutánea, brinda una mejor protección a los animales debido a su lenta eliminación, en comparación con la dosificación oral, que al estar recirculando, puede ser que se elimine rápido. En lo que se refiere a las dosis, la que produjo mayor protección fue la alta de 7.5 mg/Kg, aunque en la segunda administración, su efecto fue insuficiente, probablemente debido a la elevada carga parasitaria, pues la dosis se administró después de la temporada de lluvias, momento de mayor riesgo de una reinfección, debido a las condiciones favorables para el desarrollo del parásito, así como la abundancia de forraje y agua contaminados con metacercarias. Se recomienda, en posteriores estudios evaluar diferentes calendarios de desparasitación, en este ejercicio en particular, en base a la dinámica de coproantígenos se sugiere una administración en julio, posteriormente otra en septiembre para evitar el incremento de excreción de huevos y parásitos. Para el segundo semestre de la investigación, se debe evitar el pico de producción de antígenos del mes de junio.

Porcentaje de reducción de hpg y de muestras positivas

A través del porcentaje de reducción se trató de calcular la reinfección, pero debido a las condiciones del presente trabajo, y el tipo de diseño del experimento, es difícil conocer el momento de la reinfección, pues los animales se encontraban bajo el sistema de pastoreo, por lo que el riesgo es constante; creemos que para demostrar la reinfección se deben hacer necropsias y tener animales centinelas, en nuestro estudio, sólo se señalará el porcentaje de reducción. Después de la primera y tercera aplicaciones del closantel, la reducción de huevos y muestras fue del 100%, coincidiendo con Mage *et al.*,⁹⁵ y Quíroz *et al.*,⁹⁹, Posteriormente se presentó una reducción que se puede interpretar como reinfección, pues los

animales se encontraban en pastoreo, y en parte debido a la maduración de los estadios juveniles que no fueron eliminados por el closantel, de acuerdo con Fairweather *et al.*,⁸⁸ y Mohammed-Ali *et al.*,⁸⁹ el fármaco no elimina estadios inmaduros menores de 6 semanas, aunque pueden ser dañados. Es probable que se estuvieran detectando trematodos, que habían alcanzado la madurez e iniciado su postura, lo cual incrementó el porcentaje de muestras positivas, así como la cantidad de huevos por gramos de heces. Después de la segunda administración del antiparasitario, el grupo 3 no presentó el mismo comportamiento que los otros grupos; aunque se trató de tener animales homogéneos, en lo que se refiere a la raza, eran cruces de razas europeas con cebú, esto pudo haber afectado el resultado, pues existe un efecto de raza y edad, como lo observaron Sánchez-Andrade *et al.*,¹⁰⁰ en un área endémica en Galicia, España.

Cinética de excreción de huevos de *F. hepatica*

Al observar la cinética de eliminación de huevos, podemos apreciar que en el día 1 (julio), se presentó una mayor cantidad de huevos, posteriormente, a pesar de tener el 80% de los animales positivos, en el momento de la segunda aplicación del closantel, la excreción de huevos se redujo 54.16%, lo que posiblemente se debió a lo que señalan Fairweather *et al.*,⁵⁶ Dichos autores, que este fármaco daña las células vitelinas, así como la espermatogénesis. Parecería que el parásito ha sido eliminado después del tratamiento, pues se observan algunos muestreos donde no se detectaron huevos del trematodo, pero al comparar con la cinética de coproantígenos (CAg), se aprecia que después de la primera y tercera aplicaciones, existe una disminución de los CAg, es necesario remarcar, que en ambas fechas, los animales salían de la temporada de sequía, por lo cual, se piensa que tenían menos probabilidad de infectarse, pues la escasa humedad, principalmente, no favorece al desarrollo del parásito, además de que el pasto en las praderas era escaso. Contrario a esta situación, después de la segunda administración del closantel, no se detectaron huevos, pero la concentración de CAg, no disminuyó. Es muy probable que la carga parasitaria

fuera elevada, pues la temporada de lluvias, había finalizado (diciembre), las fases maduras habían sido eliminadas, puesto que no se detectaron huevos, pero los estadios inmaduros habían quedado en el huésped y el closantel, es posible que hubiera dañado su tegumento y algunos otros órganos, como lo señalan Fairweather *et al.*,⁸⁸; pudieron existir desprendimientos celulares de estas partes afectadas, por lo cual se lograron detectar cantidades de CAg muy similares a las que se observaron antes del tratamiento.

Correlación

Por último, al correlacionar las concentraciones de los coproantígenos con los resultados de hpg en cada periodo de estudio, se encontró que en la primera parte del trabajo (julio-diciembre), existe una fuerte relación entre la concentración de CAg con la cantidad de huevos que se detectaron en las muestras. En la segunda parte del experimento, que corresponde a los meses de enero a julio del 2005, no se encontró correlación entre ambos parámetros, lo que significa, que en esta temporada, la técnica de diagnóstico toma mayor relevancia, pues por medio de los CAg, se puede detectar la presencia del parásito en el huésped, a pesar de no encontrar huevos; esto implica que existen formas que no están produciendo huevos, pero ya están establecidas en los ductos biliares, además de que al estar en una zona de alta prevalencia, la reinfección es constante y las formas inmaduras ocasionan daños al momento de migrar a través del hígado, o provocan obstrucción cuando han llegado a los ductos biliares para alcanzar la madurez.^{3, 53} La correlación encontrada difiere de las reportadas por Abdel –Rahman *et al.*,⁸⁵, este grupo de investigadores reportan una $r=0.39$ en vaquillas provenientes de una zona libre de fasciolosis, posteriormente las inocularon y sólo colectaron muestras de la semana 1 a la 13 posinfección, para sacrificarlas a la semana 14, mientras que Duménigo *et al.*,⁹⁰, reportaron una $r=0.24$, pero trabajaron con sólo una muestra de heces de ovinos en Cuba, por su parte, Pelayo *et al.*,¹⁰¹ estudiaron pacientes en diferentes fase de la infección, hasta 70 días después de iniciados los síntomas clínicos, en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” en Cuba y

encontraron una correlación de $r=0.66$. La diferencia entre la correlación que se encontró en nuestro trabajo con los otros investigadores, se debe principalmente al tiempo en que se realizó el estudio, la presente investigación se realizó durante 13 meses, con una muestra considerable de animales, esto permitió relacionar el fenómeno de la producción de huevos y la concentración de CAg con algunos fenómenos ambientales como la presencia de lluvias y la temperatura ambiente, por otra parte, la disponibilidad de alimento y agua son otros factores que ayudan a entender el resultado obtenido. Además, el número de muestras utilizadas tiene un impacto dentro del análisis estadístico, esto es, si el número es pequeño, existe una mayor influencia de observaciones aberrantes, en nuestro trabajo, el número de muestra es considerable.

Finalmente, se sugiere que se realicen una mayor cantidad de estudios sobre coproantígenos. Por otra parte, un anticuerpo monoclonal de una fase inmadura del parásito, podría ser otra herramienta alternativa para diagnosticar la infección antes de la 4ta semana pos-infección. Para el área de farmacología, queda el reto de investigar nuevos compuestos que brinden una mayor protección a los animales de interés zootécnico, evitando que los animales desarrollen resistencia hacia los compuestos usualmente utilizados. Otra tarea que aún queda pendiente, es establecer calendarios de desparasitación en base a cada región geográfica y tipo de producción.

5. CONCLUSIONES

Se realizó la estandarización del ELISA para CAg de *F. hepatica* en bovinos y se determinó la concentración de CAg en un rango de 0.01 a 26 µg/mL en las muestras positivas.

Se logró diagnosticar la fasciolosis mediante coproantígenos en bovinos infectados y reinfectados de manera natural, y tratados con closantel durante los 13 meses de estudio.

La mejor vía de administración del closantel fue la subcutánea, mientras que la dosis que presentó mayor efecto en la reducción de huevos de *F. hepatica* en bovinos fue la de 7.5 mg/kg. En la dinámica de coproantígenos no se encontró diferencia entre las vías de administración, ni entre dosis.

6. LITERATURA CITADA

1. Howell MJ, Boray JC. Host immunity in fasciolosis. In: Immunology, pathobiology and control of fasciolosis. Editor Boray JC, Round table conference ICOPA VIII, Izmir .1994; 21–28.
2. Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª edición. Nueva editorial Interamericana. 1987; 36-51.
3. Rojo VF. Fasciolosis. En: Parasitología veterinaria. Editores Cordero del Campillo y Rojo VF. McGraw-Hill Interamericana. 1999; 260-282.
4. Quiroz RH. Epidemiología de la fasciolosis: Frecuencia en animales domésticos en México. En: Temas selectos de parasitología. 2000; 1: 130-151.
5. Dunn AM. Helmintología veterinaria. Editorial El Manual Moderno S.A de C.V. Traducción de la Segunda edición. 1983; 109-117.
6. Rangel RLJ, Martínez DE, Ruíz LJR, Durán EM. Pérdidas económicas por decomisos de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. Veterinaria México 1994; 25 (4): 327-331.
7. Encinas GR, Quiroz RH, Guerrero MC, Ochoa GP. Frecuencia de *Fasciola hepatica* e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería México D.F. Veterinaria México. 1989; 20 (4): 423-426.
8. Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. Journal of Veterinary Medicine British 1991; 38: 203-208.

9. Ross JG. The economic of *Fasciola hepatica* infection in cattle. British Veterinary Journal 1970; 126: 13–15.
10. Castellanos HAA, Escutia SI, Quiroz RH. Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas Tipo Inspección Federal en México de los años 1979-1987. Veterinaria México 1992; 23 (4): 339-342.
11. Palacios FA. Prevalencia y pérdidas económicas en hígados decomisados por *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en el rastro de Compostela Nayarit. Memorias. 34 Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Qro. Querétaro octubre 1998. Memorias. pág 244.
12. Davis WC, Hamilton MJ. Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals. Veterinary Immunology and Immunopathology 1998; 63: 7-13.
13. Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM. Bovine type 1 and type 2 responses. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1998; (63): 45-55.
14. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. Infection and Immunity. 2005; 73 (1): 166-173.
15. Shoda LKM, Rice-Ficht AC, Zhu D, McKown RD, Brown WC. Bovine T cell response to recombinant thioredoxin of *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology. 1999; 82: 35-47.
16. Bautista GCR. Respuesta Inmune En: Fasciolosis. Editado por Flores Cr, Quiroz RH, Ibarra VF. INIFAP-Sector Pecuario Palo Alto, D.F. 1986; 197-234.

17. Alcalá CY. Respuesta immune fasciolosis. En: Temas selectos de parasitología. 2000; 1:108 – 114.
18. Ortiz PL, Claxton JR, Clarkson MJ, McGarry J, Williams DJL. The specificity of antibody response in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 2000; 93: 121-134.
19. Bossaert K, Farnir F, Leclipteux T, Protz M, Lonneux JF, Losson B. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 2000; 87: 103-123.
20. Clery D, Torgenson P, Mulcahy G. Immune response of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 1996; 62: 71-82.
21. Hoyle DV, Taylor DW. The immune response of regional lymph nodes during the early stages of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunology* 2003; 25: 221-229.
22. Clery DG, Mulcahy G. Lymphocyte and cytokine response of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 1998; 65: 169-171.
23. Haroun ETM, Hillyer GV. Resistance to fascioliasis- A review. *Veterinary Parasitology* 1986 20: 63-93.
24. Reddington JJ, Leid RW, Wescott RB. A review of the antigens of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 1984; 14: 209- 229.
25. Milligen FJ, Cornelissen JBWJ, Bokhout BA. *Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an

immunoreactive 32 kDa protein, induces strong protective immunity in rats. *Experimental Parasitology* 2000; 94: 163-171.

26. Sampaio SML, Correia CJM, Da Costa AMV, Pires MA, Lopes SA, Castro AM, Monjour L. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepática* recognized in human infections. *America Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 1996; 54 (2): 146 -148.
27. Irving DO, Howell MJ. Characterization of excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 1982; 85: 179-187.
28. Rivera MCA, Santiago N, Hillyer GV. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *Journal Parasitology* 1988; 74 (4): 646-652.
29. Leclipteux Th, Torgerson PR, Doherty ML, McCole D, Protz M, Farnir F, Losson B. Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Parasitology* 1998; 77: 103-114.
30. Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology* 2005; 79: 241-247.
31. Irwin JA, Morrissey PEW, Ryan JP, Walshe A, O'Neill SM, Carrington SD, Matthews E, Fitzpatrick E, Mulcahy G, Corfield AP, Dalton JP. Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 2004; 129: 465-472.
32. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Limusa, México D.F. 1986; 231 - 267.

33. Arriaga DC, Bautista GCR. Revisión bibliográfica sobre el diagnóstico serológico de algunas helmintiasis en rumiantes. *Técnica Pecuaria México* 1997; 35 (2): 105-114.
34. Montenegro CN. Técnicas inmunoenzimáticas en el diagnóstico inmunoparasitológico de *Fasciola hepatica*. En: Temas selectos de parasitología. 2000; 1: 32-41.
35. Gorman T, Sánchez R, Fredes F, Alcaíno H. Inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina mediante ELISA y Western blot. *Parasitología al Día* 1998; 22 (1-2): 1-9.
36. Gorman T, Aballay J, Fredes F, Silva M, Aguillón JC, Alcaíno HA. Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using Western blots. *International Journal for Parasitology* 1997; 27 (11): 1429-1432.
37. Lebrija IA, Gómez AA, Arriaga MC, Ibarra F, Morilla A. Algunas características de la prueba de intradermorreacción para el diagnóstico de la fasciolosis de los bovinos. *Veterinaria México* 1981; 12: 5-12.
38. Gonzalo-Orden M, Millán L, Álvarez M, Sánchez-Campos S, Jiménez R, González-Gallego J, Tunon MJ. Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitology Research*. 2003; 90 (5): 359-364.
39. Scherer PO, Pile EA, Serra-Freire NM, Da Schaffer GV. Puncture-biopsy technique for histopathological diagnostic in ovine fascioliasis. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo*. 1999; 36 (4/6): 219-222.

40. Magnaval JF. The diagnosis of hypereosinophilia in travelers. *Medecine Tropicale*. 2003; 63 (2): 131-133.
41. Perler L, Gottstein B, Borioli A. Fasciolosis in horses: practical approach. *Pratique Vétérinaire Equine*. 1997; 29 (3): 159-161.
42. Braun U, Wolfensberger R, Hertzberg H. Diagnosis of liver flukes in cows a comparison of the findings in the liver, in the feces, and in the bile. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*. 1995; 137 (9): 438-444.
43. Kaplan RM, Dame JB, Ready GR, Courtney CH. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *Int. Journal for Parasitology* 1997; 27 (12): 1585-1593.
44. Conceicao MAP, Durao RM, Costa IH, Costa JMC. Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Veterinary Parasitology* 2002; 105 (4): 337-343.
45. Anderson N, Luong TT, Vo NG, Bui KL, Smooker PM, Spithill TW. The sensitivity and specificity of two methods for detecting fasciola infections in cattle. *Veterinary Parasitology*. 1999; 83 (1): 15-24.
46. Maisonnave J. Standardization of a dot immunoperoxidase assay for field diagnosis of *Fasciola hepatica* infected cattle. *Veterinary Parasitology* 1999; 85: 259 -268.
47. Ibarra VF, Montenegro CN, Vera MY, Boulard C, Quiroz-Romero H, Bautista GCR, Vázquez PC. DIG-ELISA: estandarización y evaluación serodiagnóstica en fasciolosis bovina experimental y natural. *Veterinaria México* 1997; 28 (1): 7-12.

48. Mezo M, González-Warleta M, Ubeira FM. Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. *Journal of Parasitology*. 2003; 89 (4): 843-849.
49. Almazán C, Avila G, Quiroz H, Ibarra F, Ochoa P. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology* 2001; 97: 101-112.
50. Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez J, Panadero R, Díez-Baños P, Morrondo P. Use of sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology* 2000; 93: 39 -46.
51. Vargas LD, Del Pino AS, González TCG, Vidal OM. Implementación de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis equina. *Boletín Chileno de Parasitología* 2001; 57 (3-4): 1-6.
52. Silva MLS, Costa JMC, Da Costa AMV, Da Pires MA, Lopes SA, Castro AM, Monjour L. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 1996; 54 (2): 146-148.
53. Reichel MP, Vanhoff K, Baxter B. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology* 2005; 129: 61-66.

54. Anaya RM, Davila G. Quimioterapia En: Fasciolosis. Editado por Flores Cr, Quiroz RH, Ibarra VF. INIFAP-Sector Pecuario Palo Alto, D.F. 1986; 425-465.
55. Martin RJ. Review: Modes of Action of Anthelmintic Drugs. The Veterinary Journal 1997; 154: 11-34.
56. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. Veterinary Journal 1999; 158: 81-112.
57. Swan GE. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintics use in animals. Journal of the South African Veterinary Association. 1999; 70 (2): 61– 70.
58. Maes L, Lauwers H, Deckers W, Vanparijs O. Flukicidal action of closantel immature and mature *F. hepatica* in experimentally infected and sheep. Research in Veterinary Science 1988; 44: 229-232.
59. Mohammed-Ali NAK, Bogan JA. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxyclosanide. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutic 1987; 10: 127-133.
60. Pax RA, Bennett JL. Effect of closantel on intrategumental pH in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. Journal of Parasitology 1989; 75(1): 169-171.
61. Bacon JA, Ulrich RG, Davis JP, Thomas EM, Johnson SS, Conder GA, Sangster NC, Rothwell JT, McCrackens RO, Lee BH, Clothier MF, Geary TG, Thompson DP. Comparative in vitro effects of closantel and selectes β -

ketoamide anthelmintics on a gastrointestinal nematode and vertebrate liver cells. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic* 1998; 21: 190-198.

62. SEGOB. 2000. Enciclopedia de los municipios de México. Secretaría de Gobernación [web en línea]. Disponible desde internet : <http://www.e-local.gob.mx/eb2/ELOCAL/ELOC-Enciclopedia> [con acceso el día 01 de junio de 2005].

63. Estación meteorológica del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-silvo Pastoril (C.E.I.E.P.A.S.P) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en el municipio de Chapa de Mota, estado de México. Datos de julio del 2004 a julio del 2005.

64. Cruz-Mendoza I, Figueroa JA, Correa D, Ramos-Martínez E, Lecumberri-López J, Quiroz-Romero H. Dynamic of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in rural locality of Mexico. *Veterinary Parasitology* 2004; 121: 87-93.

65. INEGI. [web en línea]. Disponible desde internet: http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem03/info/df/m012/c09012_01xls [con acceso el día 24 de junio de 2006].

66. Happich FA, Boray CJ. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 2. The estimation on daily total egg production of *Fasciola hepatica* and the number of adult flukes in sheep by faecal egg counts. *Australian Veterinary Journal* 1969; 45: 329– 331.

67. Almazán GMC. Detección de antígenos de *Fasciola hepatica* en heces y suero de ovinos por medio de ELISA. Tesis de Maestría en

Ciencias Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1997. 91p.

68. Espino AM, Dumenigo BE, Huesca N, Finlay CM. Mantenimiento in vitro de adultos de *F. hepatica*: Obtención de antígenos de excreción-secreción. *Revista de Salud Animal* 1988; 10: 287-293.
69. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72: 248-254.
70. Correa BMD, Cañedo SI, Ortiz ALB, Meza LA, Coballase UE, Rico TC, Medina EE, Mandujano MA, Medina FY, Hernández IJL, Luna PH. Manual de Procedimientos de Laboratorio. Curso Teórico Práctico de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos Abril 26 al 30 de 2004.
71. Correa BMD. Los antígenos del cisticerco de *Taenia solium*: aspectos básicos y aplicación en el diagnóstico clínico y en estudios epidemiológicos. Tesis doctoral. Unidad Académica de los ciclos Profesionales y de Posgrado del CCH/Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 1998; 190p.
72. Margolis L, Esch GW, Holmes JC, Kuris AM, Schad GA. The use of ecological terms in parasitology (Report of AN AD HOC Committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology* 1982; 68 (1): 131-133.
73. Eckert, J, Schneiter G, Wolf K. Fasinex (triclabendazol) ein neus Fasziolizid. *Berliner und Müendchener Tierärztliche Wochenschrift* 1984; 97: 349-356.

74. Greenberg RS, Daniels RS, Flanders DW, Eley WJ, Boring RJ. Epidemiología médica. 2ª edición, México: El Manual Moderno. 1988; 122-123.
75. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Kassai T, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Taylor SM, Vercruysse J. Second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine) In: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). 1993; 46p.
76. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Kassai T, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Taylor SM, Vercruysse J. Anthelmintics for bovines and ovines: specific requirements In: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). 1994; 167-175.
77. Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª edición. Limusa Wiley. 1986; 658– 718.
78. Steel RGD, Torrie JH. Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición. México. McGraw-Hill. 1988; 622.
79. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. Journal of Animal Science 1998; 76: 1216-1231.
80. Herrera HJG, Barreras SA. Manual de procedimientos. Análisis estadísticos de experimentos pecuarios (utilizando el programa SAS). Colegio de Postgraduados. Texcoco, estado de México. 2001;119p.
81. SAS. Institute, Inc. SAS user's guide: statistics, statistical.

Versión 6. Cary, North Carolina, U.S.A. 1990; 956p.

82. Boulard C, Carreras F, Van Gool F. Evaluación of nitroxinil and closantel activity using ELISA and egg counts against *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected cattle. *Veterinary research* 1995, 26: 249-255.
83. Molloy JB, Anderson GR, Fletcher TI, Landmann J, Knight BC. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology* 2005, 130: 207-212.
84. Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Pedreira J, Suárez JL., Díez-Baños P, Morrondo P. Aplicación de la detección de antígenos circulantes en la evaluación de antihelmínticos en la evaluación de antihelmínticos en ovejas con fasciolosis natural. *Medicina Veterinaria* 1999; 16 (9); 429– 433.
85. Abdel-Rahman SM, O'Reilly KL, Malone JB. Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28- kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle.
86. Mezo M, González-Warleta M, Carro C, Ubeira FM. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology* 2004; 90 (4): 845-852.
87. Duménigo BE, Mezo M. Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Research in Veterinary Science* 1999; 66: 165– 167.

88. Fairweather I, Boray JC. Mechanism of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. In Fasciolosis edited by Dalton JP. Republic of Ireland. 1999; 225-276.
89. Mohammed-Ali NAK, Bogan JA. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxcyclosanide. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutic 1987; 10: 127– 133.
90. Duménigo RBE, Finlay VCM. Detección y cuantificación de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. Revista Cubana de Medicina Tropical. 1998; 50 (1): 82-84.
91. Duménigo BE, Espino AM, Finlay CM. Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. Research in Veterinary Science 1996, 60: 278-279.
92. Bouvry M, Rau ME. Seasonal variations in eggs passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. Veterinary Parasitology 1986; 22: 267-273.
93. Phiri AM, Phiri IK, Siziya S, Sikasunge CS, Chembensofu M, Monrad J. Seasonal pattern of bovine fasciolosis in the Kafue and Zambezi catchment areas of Zambia. Veterinary Parasitology 2005; 134: 87–92.
94. Cerrud SNI, Quiroz RH. Valoración de huevos de *Fasciola hepatica* en heces de ovino tratados con closantel y nitroxinil. Veterinaria México 1995; 26(2): 151 -154.
95. Mage C, Mollet JP, Reynal PH. Efficacité du closantel injectable (Flukiver) sur l'infestation naturelle des bovins par *Fasciola hepatica*.

Revue Médecine Vétérinaire 1997; 148 (10): 777-780.

96. Ibarra VF, Montenegro CN, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. Veterinaria México 2002; 33 (3): 237-245.
97. Ibarra VF, Vera MY. Comparación del efecto extensivo de cinco fasciolicidas en bovinos en clima cálido. Veterinaria México 1991; 22 (2): 159-163.
98. Swan GE, Koeleman HA, Steyn HS, Mülders MSG. Intravascular plasma disposition and salivary secretion of closantel and rafoxanide in sheep. Journal of the South African Veterinary Association 1999; 70 (2): 75– 79.
99. Quiroz RH, Ríos AN. Efecto del triclabendazol y del closantel en la reducción de huevos de *F. hepatica* en ganado bovino estabulado. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología, Zacatecas, México. Asociación Mexicana de Parasitología. 1998.
100. Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez JL, Panadero R, Pedreira J, López C, Díez-Baños P, Morrondo P. Influence of age and breeds on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). Veterinary Research Communications 2002; 26: 361– 370.
101. Pelayo L, Espino AM, Duménigo RBE, Finlay VCM. Detección de anticuerpos, antígenos y complejos inmunes circulantes en la fasciolosis aguda y crónica. Resultados preliminares. Revista Cubana de Medicina Tropical 1998; 50 (3): 209-214.

Anexo 1. Resultado del análisis estadístico de la concentración de CAg de *F. hepatica* en bovinos con infección natural en el primer semestre.

Grupo	Primer semestre de estudio					
	05 Agt	02 Sep	28 Sep	26 Oct	23 Nov	10 Dic
	28	56	82	112	138	155 Tx
Grupo 1 Subcut 5mg/kg	0.045±2.85 ^a	2.991±2.85 ^a	8.965±3.11 ^a	16.715±2.85 ^a	18.192±5.60 ^a	13.748±2.85 ^a
Grupo 2 Subcut. 7.5mg/kg	0.222±3.49 ^a	5.760±4.01 ^a	25.810±4.01 ^b	22.895±3.49 ^a	4.049±9.73 ^a	18.574±3.72 ^a
Grupo 3 Oral 10mg/kg	0.046±3.12 ^a	0.798±3.28 ^a	11.067±3.12 ^a	16.002±3.12 ^a	26.152±4.87 ^{ab}	20.253±3.12 ^a
Grupo 4 Oral 15mg/kg	1.291±2.97 ^a	5.935±2.97 ^a	16.311±2.85 ^a	19.517±2.85 ^a	18.478±3.98 ^a	15.843±2.97 ^a

Literales diferentes en columna, se encontró diferencia estadística (P<0.05)

Subcut = Subcutáneo

Tx = Tratamiento

Anexo 2. Resultado del análisis estadístico de la concentración de CAg de *F. hepatica* en bovinos con infección natural en el segundo semestre.

Grupo	Segundo semestre de estudio				
	18 Ene	15 Feb	12 Abr	11 May	07 Jun
	186	222	278	306	334 Tx
Grupo 1 Subcut 5mg/kg	15.379±4.25 ^a	4.565±3.19 ^a	2.887±3.20 ^a	5.948±3.95 ^a	9.199±3.19 ^a
Grupo 2 Subcut 7.5mg/kg	24.702±5.20 ^a	16.349±3.75 ^b	0.310±3.99 ^{ab}	5.775±4.29 ^a	23.096±3.75 ^b
Grupo 3 Oral 10mg/kg	19.333±4.65 ^a	8.176±3.36 ^{ab}	6.053±3.36 ^{ab}	1.774±3.72 ^a	14.428±3.53 ^{ab}
Grupo 4 Oral 15mg/kg	12.764±5.18 ^a	12.001±3.52 ^{ab}	4.177±3.35 ^a	3.517±3.52 ^a	14.476±3.35 ^{ab}

Literales diferentes en columna, se encontró diferencia estadística (P<0.05)

Subcut = Subcutáneo

Tx = Tratamiento

Anexo 3. Resultado del análisis estadístico de la concentración de CAg de *F. hepatica* en bovinos con infección natural y el efecto del closantel.

Dosificación	ANTES	DESPUES	DIFERENCIA	VALOR <i>t</i>	Pr> <i>t</i>
1ra	4.043±1.22	0.306±0.18	3.154	2.54	0.0152
2da	17.221±1.71	17.811±2.62	-3.204	-0.77	0.4540
3ra	14.653±1.85	1.085±0.96	15.240	6.75	<0.0001

Antes = momento de la administración del closantel

Después = se midió 28 días pos-tratamiento.