

419
22



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN**

**"DESARROLLO DE UNA TECNICA
(IHA) HEMAGLUTINACION INDIRECTA
PARA EL DIAGNOSTICO DE LA
LINGUATULIASIS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

REYNA DIAZ CRISTINA

DIRECTOR: M. V. Z.

Juan Pablo Martínez Labat

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 1986.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

R E S U M E N

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar una técnica diagnóstica para contribuir al estudio de la linguatuliiasis y que pueda ser aplicada a las distintas especies que afecta. La técnica que se probó fue Hemaglutinación Indirecta debido a que esta es una técnica accesible a cualquier laboratorio de diagnóstico. Se estimuló el desarrollo de inmunidad contra Linguatula serrata en animales de experimentación (carneros), mediante la inoculación por vía subcutánea de antígeno completo, elaborado a partir de ninfas del parásito obtenidas de vísceras de ovinos y caprinos parasitados. A los 30 días de la primera inoculación se sangraron a los carneros, así como a un carnero que ya estaba parasitado en forma natural y que se tomó como control positivo. Estos sueros se emplearon para la determinación de anticuerpos. En la técnica se usaron eritrocitos de humano sensibilizados con Cloruro de Cromo y eritrocitos de carnero sensibilizados con ácido tánico. La técnica dió resultados positivos aunque hay una diferencia en cuanto a sensibilidades, pues en el tratamiento con ácido tánico se detectan cantidades más pequeñas de anticuerpos comparada con el Cloruro de Cromo.

Consideramos que los resultados obtenidos contribuyen a facilitar el diagnóstico de la linguatuliiasis.

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

Uno de los principales hechos ante los cuales se encuentra el hombre, es la lucha por la existencia que sostiene ante cualquier organismo, parásito, que lo pueda atacar desde el momento de su concepción hasta su muerte (10, 11).

Al nacer en un medio ambiente que se encuentra contaminado, el organismo humano entra en contacto con una gran variedad de especies bacterianas denominada flora normal que establece una residencia más o menos permanente. En general no causa alteraciones de la salud pues hay simbiosis e incluso benefician al hospedador de muy diversas maneras, aunque también hay bacterias que le pueden causar daño (10).

Un parásito es el organismo que vive sobre o dentro de otro organismo vivo donde encuentra su habitat, los parásitos más afortunados son los que logran un equilibrio con el hospedador, si el parásito lesiona al hospedador en grado suficiente ocasiona trastornos en éste que se manifiestan como enfermedad, en casos como en personas con problemas de metabolismo, los individuos debilitados y los que están sometidos a un tratamiento con esteroides u otros fármacos que deprimen el mecanismo inmune normal, son susceptibles a una enfermedad microbiana probablemente porque el hospedador ofrece al agente una oportunidad de propagarse excesivamente. Existe un gran número de enfermedades que pueden atacar al hombre entre las que se encuentran las causadas por virus, algunas de ellas: el sarampión, hepatitis viral, la poliomielitis etc; las causadas por bacterias como la salmonelosis, brucelosis, neumonía, tuberculosis etc; también se encuentran las causadas por hongos, muchos de los cuales provocan enfermedades en el hombre, como el algooncillo, causado por Candida albicans y las tiñas que son causadas por los dermatofitos.

Además el hombre puede ser atacado por enfermedades producidas por parásitos de otras especies, como la amibiasis, ascariasis, toxocariasis etc.

Todos los organismos comentados son considerados como parásitos tanto macroscópicos como microscópicos pero en general la Parasitología se ha enfocado al estudio de cuatro grupos: Protozoarios, Helminthos, Artrópodos y Pentastómidos (10,13).

Meyhrne (1961) dice que las enfermedades parasitarias son índice de las condiciones del medio ambiente y de la población.

Un índice elevado de parasitosis intestinales revelan una marcada deficiencia de sanidad, nivel de vida e higiene. La teniasis, la triquinosis y la hidatidosis indican condiciones de pobreza y poco control en el sacrificio de animales así como condiciones sociales que permiten la expansión de estas enfermedades y una sanidad ambiental inadecuada. La enfermedad de Chagas y la presencia de triatominos están determinados por condiciones de pobreza en las construcciones de habitación humana, falta de higiene y baja condición social y económica de la población (9,10).

De este modo, el control y prevención de parasitosis, están íntimamente ligados con el agente causal y el hombre en su condición ignorante sufre las enfermedades de un medio ambiente apropiado.

El hombre puede ser atacado por diferentes enfermedades parasitarias y por muy variables formas como pueden ser: La amibiasis que resulta de la ingestión de quistes viables de Entamoeba histolytica que llega a la boca por ingestión de alimentos o agua contaminada. El caludismo es el azote del hombre, ubicada en los países de clima cálido y transmitida por el mosco Anopheles (10,35).

La toxoplasmosis se halla muy extendida por todo el mundo en el hombre, a veces se adquiere in utero y sus consecuencias aminoran generalmente la muerte del feto o deja secuelas graves en el recién nacido (10,13).

La triquinosis resulta de la ingestión de otro hospedador que contenga las larvas encistadas del agente causal que es la Trichinella spiralis. El hombre adquiere la infestación principalmente por consumo de carne de cerdo y rara vez de algunos mamíferos. Las uncinarias están completamente diseminadas por todos los países de clima cálido y húmedo (10,13).

La ascariasis es hiperendémica en los trópicos y muy común en algunas zonas del sureste de los Estados Unidos. Los niños pequeños que defecan dentro o alrededor de sus casas son los más frecuentemente parasitados (10,13).

La hidatidosis es producida por Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis y Echinococcus oligartus. El perro y sus congéneres son los hospedadores definitivos, mientras que las ovejas, cerdos y el hombre son parasitados por las fases larvarias (Quiste hidatídico) (10,13).

Dentro del Phylum Pentastomida se encuentra Linguatula serrata, grupo de reciente creación dada sus características morfológicas y su ciclo evolutivo. Los linguatúlidos fueron descritos desde 1705 por Wrisberg (Gottinga) y descritos por Charbert (1787), que los encontraron en las fosas nasales de perros y caballos. Poco después descubrió Frölich (1789) en Alemania este parásito en el pulmón de una liebre. Cameron (1956) comentó que es posible que deriven de los anélidos; otros los clasifican dentro de los artrópodos arácnidos (Piermarzski 1959, Chenev 1961, Faust y Russell 1964, Pessoa 1967, Sculby 1968) (31).

La totalidad de los pentastómidos son parásitos estrictamente endoparásitos, se localizan en las vísceras, cavidades nasales, torácica y abdominal de los reptiles, mamíferos y otros organismos. Siendo los mamíferos, los cánidos y los ruminantes en los que con mayor frecuencia se han encontrado estos organismos.

Este grupo se caracteriza en cuanto a su morfología y hábitos por ser: Endoparásito hematófago, el cuerpo es elongado y vermiforme (23,32).

No existe una separación clara entre cabeza, tórax y abdomen. Por lo general, la parte anterior se denomina cefalotórax y la parte posterior suele denominarse abdomen (24).

La boca puede ser circular, cuadrada o elíptica, provista de una base quitinosa de estructura variada y situada en posición anterior o posterior de dos huecos de donde emergen dos pares de ganchos de tipo quitinoso que salen de cuatro orificios o sacos que están dispuestos en forma trapezoidal o en forma de arco. Los ganchos pueden ser iguales, lisos o aserrados simples o dobles (35).

El ano es terminal o subterminal, los sexos están divididos, presentando un dimorfismo sexual. Por lo general los machos son notablemente más pequeños comparados con las hembras; siempre se les encuentra en número inferior al de éstas por lo que se piensa que poseen una vida más corta (31).

Los genitales se abren en línea media ventral en la parte anterior al abdomen en el macho y en la hembra puede ser en la parte anterior o posterior, la vulva se abre más o menos cerca del ano pero siempre es anterior a él. El aparato genital masculino consta de uno o dos testículos, a los que sigue un conducto deferente que lleva a una vesícula seminal que se encuentra

bifurcada por la presencia de dos ciegos (23,27,35).

El aparato genital femenino está constituido por un ovario que es un órgano largo situado dorsalmente que usualmente se extiende longitudinalmente en la región del abdomen. Anteriormente se divide en dos oviductos que corren paralelos al conducto alimenticio. En el punto donde este conducto se abre al útero existen las dos desembocaduras de los conductos de las espermatecas que son dos, ya que el útero funciona también como vagina (12,15,29).

Existen en la literatura más de ochenta citas bibliográficas en diferentes países que involucran todos los continentes teniendo una distribución mundial donde se reportan tanto las fases adultas como ninfales en distintas especies y localizaciones.

Se han observado a menudo en los cadáveres humanos invasiones por pentastómidos causadas por los estadios juveniles de Linguatula serrata y también accidentalmente en forma secundaria en algunas otras enfermedades en humanos vivos (31).

En las personas adultas se ha encontrado Linguatula serrata con preferencia en el hígado, por lo general en el lóbulo izquierdo (Sonobe 1927), superficialmente por debajo de la cápsula hepática, aunque también en la parte intestinal, en los ganglios mesentéricos, en el bazo, en el pulmón o libremente en el mesenterio (Heymons 1942), cámara anterior del ojo, seno maxilar, seno frontal y fosas nasales (2,11,15,27,31,32).

Un caso entre los tantos reportados es el de Laudon (1870) de un soldado alemán que sufría de dolor a la presión en la mitad izquierda de la nariz y tenía frecuentes epistaxis. Después de un violento estornudo apareció en el orificio izquierdo de

la nariz un gran "linguatulid " hembra, desapareciendo todas las molestias (11,31).

Más frecuentemente que en nuestras latitudes es la invasión por pentastómidos en África tropical. También aquí han sido hallados en necropsias y sin relación con procesos patológicos o como causa de muerte (Gribdohm 1877, en Kiel en un 1.2% de los casos investigados).

En nuestro país existen varios reportes del hallazgo de Linguatula serrata en su fase adulta, Chavarria (1936), Biagi y Schacher (1966), Cruz (1972) en Canis familiaris, así como el hallazgo de las fases ninfales, Hidalgo (1936), Biagi y Schacher (1966), en Bovinos, Ovinos y Caprinos. De Leon y Alvarez Chacon (1980) encontraron accidentalmente un caso de un niño que fue atendido en el Hospital del Instituto Nacional de Pediatría (antes IMAN). El niño presentaba trastornos respiratorios por lo que se le realizó una lobectomía y al hacer cortes histológicos de este tejido se encontró accidentalmente la ninfa de este parásito.

Estos reportes la hacen importante en la Salud pública ya que como vemos se han detectado tanto las fases adultas como ninfales según los casos estudiados y los análisis realizados. La infestación por Linguatula serrata puede llegar a confundirse con otras enfermedades como la tuberculosis en humanos por las lesiones que ocasiona en éstos, como podemos ver este parásito tiene importancia en nuestro país, por lo cual nuestro interés, ya que solo existe un reporte en humanos, esto puede ser debido a la poca difusión e importancia que hasta el momento se le ha dado a este parásito (33).

Respuesta inmune:

La respuesta inmunológica en las enfermedades parasitarias, tiene peculiaridades muy interesantes debido al tamaño de los parásitos y a los cambios evolutivos que sufren a lo largo de su vida, originando ésto la presencia de diferentes sustancias antigénicas específicas de cada fase de desarrollo del parásito dentro del hospedador (4,16).

Los parásitos y/o sus productos, actúan como antígenos que al estar en contacto con los tejidos del hospedador, estimulan la producción de anticuerpos específicos los cuales se pueden detectar en el suero del hospedador (16,21).

La variación antigénica de un parásito dentro del hospedador depende de: grupo zoológico, especie, fase de desarrollo, secreciones y excreciones (expulsadas a través de la boca y ano), antígenos somáticos (que entran en contacto con el hospedador cuando el parásito muere) (4,16,21).

Los parásitos capaces de inducir una respuesta inmune detectables, son aquellos que tienen contacto íntimo con diferentes tejidos del hospedador por vencer las barreras naturales del organismo que son el primer sistema de defensa y que pueden ser vencidas fácilmente por la inyección de formas infestantes por artrópodos transmisores, penetración activa de las larvas filariformes de algunos helmintos o por ingestión de fases infestantes (16,21).

Evación de los mecanismos de la defensa inmunológica:

En una infestación parasitaria tienen un papel importan-

te como mecanismos inmunológicos: macrófagos, eosinófilos, anticuerpos, complemento y linfocitos T dependiendo del tipo de parásito del que se trate. En algunos casos el parásito puede convivir mucho tiempo con el hospedador debido a la evasión de la respuesta inmune. Existen varios mecanismos por los que el parásito puede evadir la respuesta inmune (36).

- Cambio en el fenotipo de los antígenos de superficie como consecuencia de la interacción con anticuerpos.

- Interiorización del parásito a las células, si el parásito está dentro de la célula no expresa antígenos en el exterior de ella por lo que no es reconocido como extraño y por lo tanto no habrá respuesta contra él.

- Ciclo de vida.

De acuerdo a su ciclo de vida el parásito puede cambiar los antígenos de su superficie y por lo tanto la respuesta va a ser ineficiente (36).

- Enquistamiento

En algunos parásitos el quiste es la fase infectiva que puede estar recubierta de quitina y no expresa antígenos en su superficie por lo que no va a haber respuesta inmune.

- Destrucción directa de las células inmune.

Ejemplo; E. histolytica que es capaz de destruir rápidamente a los linfocitos no activados directamente.

- Liberación de antígenos.

Existen parásitos que liberan antígenos que van a desencadenar la respuesta inmune fuera del parásito, pueden activar complemento o causar hipersensibilidad pero no hay destrucción del parásito.

- Formación de casquete o capping.

Especialmente las amibas inducen producción de anticuerpos, hay opsonización pero después los anticuerpos son polarizados hacia un extremo y los elimina.

- Recubrimiento por antígenos del hospedador.

Existen parásitos que se incorporan al organismo del hospedador y absorben proteínas del medio recubriéndose de ellas y por lo tanto el sistema inmune no lo va a reconocer como extraño por lo que pasa desapercibido.

- Producción o liberación de metabolitos que pueden tener funciones inmunosupresoras.

De acuerdo a la clasificación taxonomica Linguatula serrata esta clasificada de la siguiente manera.

PHYLUM - PENTASTOMIDA
ORDEN - POROCEPHALIDA (R. Heymons 1935)
SUPERFAMILIA - LINGUATULOIDEA (A. Pain 1961)
FAMILIA - LINGUATULIDAE
GENERO - Linguatula (Frölich 1789)
ESPECIE - serrata

según Nicolli (1966)

Self (1969)

Morfología:

Es un endoparásito hematófago, el adulto es blanco amarillento o transparente vítreo, aplanado dorsoventralmente (1,15).

Con forma de lengua, por lo que recibe el nombre genérico de Lin
guatula o el nombre inglés de "Tongue worm", la extremidad ante-
rior es más gruesa, redondeada abultada y va disminuyendo de
grosor hacia el extremo caudal (22).

El cuerpo está cubierto por 90 anillos de espinas, hallándose
sembrado de numerosos órganos glandulares ("estigmas"). Delante
del lado ventral plano se encuentran a ambos lados dos orifi-
cios en forma de hendidura, de los cuales pueden proyectarse
hacia afuera dos sólidos pares de ganchos quitinosos. En el cen-
tro entre las cuatro hendiduras, hay un anillo bucal en forma de
U (de aquí pentastomun = cinco bocas). Carece de órganos respi-
ratorios y excretorios. La hembra por lo general, está firmemente
fijada al epitelio, sexualmente maduras tienen un promedio de 13
cms. de longitud y los machos un promedio de 6 cms. y además es-
tos son móviles en su hospedador. En ambos sexos los conductos
genitales desembocan en la cara ventral; en el macho en la prime-
ra mitad y en la hembra en la segunda (22, 23, 29).

Las ninfas son morfológicamente similares a los adultos,
siendo su cuerpo lanceolado con una longitud promedio de 5.3mm
cutícula quitinosa, existen dos pares de ganchos dobles uno a ca-
da lado de la boca, el aparato digestivo está completo y es de
recto con ano terminal (29, 31).

Epidemiología:

La epidemiología de esta parasitosis depende del contacto
de una u otra forma del hospedador definitivo, como intermedia-
rio con la población humana.

En primer lugar depende de los patrones culturales de -

alimentación de las poblaciones, pues tanto en las zonas rurales como en las grandes ciudades algunas familias consumen grandes cantidades de vísceras mal cocidas, principalmente hígado de las cuales una gran parte de estas vísceras son aportadas por grandes y pequeños ruminantes que en su mayoría son criados en un medio que favorece la infestación de estos, por el consumo de agua y forrajes contaminados con huevos de estos parásitos. Por otra parte se encuentra la alimentación de gatos perros etc., con vísceras crudas principalmente pulmón), favoreciendo con esto el ciclo biológico del parásito (15,22,23,31).

En algunos países principalmente asiáticos y africanos como en Sudan, Egipto, Libano e India en los cuales como parte de su alimentación se incluye hígado y ganglios linfáticos que son consumidos crudos o parcialmente cocidos, anulándose con esto la posibilidad de destruir las fases larvarias que van incluidas, siendo muy alto el índice de probabilidad de infestación y como consecuencia son frecuentes los reportes en poblaciones humanas en estos países (15,31).

En nuestro país solo existe un reporte en humanos, en animales se han encontrado más casos aunque no todos han sido reportados públicamente, esto puede ser debido a la poca difusión e importancia que hasta el momento se le ha dado a este parásito.

Ciclo biológico.

Los adultos se localizan en: senos respiratorios y fosas nasales, se ha encontrado en numerosos animales domésticos y salvajes como: lobo, zorro, coyote etc., todos ellos en calidad

de hospedadores definitivos, los estadios juveniles se desarrollan en hospedadores intermediarios (ovinos, bovinos, caprinos y roedores principalmente y en ocasiones en el hombre) (29, 31).

La cópula se realiza antes de que la hembra ha alcanzado la madurez sexual y al cabo de seis meses deposita sus huevos (hasta 500,000), los cuales pueden ser expulsados por el hospedador con los estornudos o bien ser deglutidos, siendo deseminados con el excremento, con los que llegan a los forrajes (12, 17, 19, 31). El desarrollo ulterior de los huevos tiene lugar en un hospedador intermediario. Se distinguen tres estadios larvarios.

Llegados al intestino del hospedador intermediario, eclosiona del huevo el embrión acariforme, de unas 75 X 50 micras de longitud, denominado larva primaria, que posee un apéndice caudiforme y cuatro garras en otros tantos parápodos, así como un aparato perforador situado en posición anterior, con el cual penetra en los vasos sanguíneos y es arrastrada, más pasiva que activamente, por las corrientes linfática y sanguínea. De este modo llegan a los órganos internos de las cavidades torácica y abdominal (ganglios linfáticos, hígado, pulmones, peritoneo, bazo etc.), donde se fijan y encapsulan dando lugar a unos nódulos, que pueden ser de interés para el control sanitario. Su pared varía según la especie del hospedador y el órgano donde se hallen. Llegan a alcanzar hasta el tamaño de un guisante y su consistencia puede ser blanda o dura (por precipitación calcárea).

Su color es blanquesino, amarillento, pardusco o algo verdoso (31)

Las larvas de tipo secundario que se originan después de una muda a partir de las larvas primarias (larvas de reposo o larvas enquistadas), las cuales no poseen aguijón perforador, ni parápodos ni ganchos. Su cutícula es lisa. Este estadio concluye

al cabo de 7 meses cuando la larva termina su novena muda pasando a la fase de ninfa terminal o espinosa que mide un promedio de 5 mm. de longitud, posee cuatro ganchos dobles y numerosas espinas cuticulares retrógradas formando a modo de collares. A los 250- 300 días del contagio, las larvas rompen su envoltura capsular y penetran como larvas libres o emigrantes en las cavidades corporales del hospedador intermediario, ésto es cuando consiguen vencer la resistencia de los tejidos capsuliformes que las rodean. Pero según lo que se sabe hasta ahora, no son capaces de proseguir su desarrollo, pereciendo si no encuentran un hospedador definitivo que los ingiera junto con las vísceras (31, 34).

Las ninfas fueron consideradas en años anteriores como género independiente, designándose con el nombre de Pentastomum. Las larvas definitivas llegan a la garganta, estómago o intestino de un perro o de un hospedador definitivo, desde el estómago ascendiendo con la ayuda de los ganchos por el esófago, emigran a las fosas nasales y allí se convierten después de una muda en adultos (34).

Patogenia:

Se consideran dos formas de linguatuliasis en los humanos. La linguatuliasis visceral que resulta de la ingestión de huevos y desarrollo de ninfas en varios órganos internos y la linguatuliasis nasofaríngea que resulta de la ingestión de ninfas que ascienden a nasofaringe (32, 35).

Linguatuliasis visceral

Linguatula serrata ha sido encontrada en humanos, en hígado

gado, bazo, pulmones, ojo, y mesenterio, en algunas partes de Africa Malasia, Java y China. Muchas infestaciones son causadas por estos pentastómidos, pocas son sintomáticas y otras no son detectadas. De hecho en muchos casos reportados fueron encontradas en autopsias y en las que la causa de muerte fue otra.

La infestación de bazo, hígado y otros órganos causan destrucción de los tejidos, las larvas se encuentran enquistadas, en hígado y pulmón se observan cambios macroscópicos como: áreas en forma abultada de consistencia dura, de color rojizo con aspecto de hemorragia e intiltración de células mononucleares (abscesos) (27, 32, 33).

Linguatuliasis nasofaríngea

Se da cuando las ninfas de Linguatula serrata invaden los espacios nasofaríngeos del humano, causan la infestación usualmente llamada "Síndrome de Halzoum" ó "Síndrome de Marrara". Hasta hace poco tiempo había confusión con respecto a la etiología de este síndrome a partir de una descripción hecha por Knouri (1905), se pensaba que dicho síndrome era causado por la ingestión de hígado contaminado con Fasciola hepática y Dicrocoelium dentriticum (34) .

Azar (1902) realizó un trabajo experimental en 92 humanos voluntarios, a un grupo le administró hígado contaminado con Fasciola hepática, a otro grupo Dicrocoelium dentriticum y a otro grupo ambos parásitos y no se encontró ningún caso que presentara sintomatología semejante a el "Síndrome de Halzoum" (2, 25).

La linguatuliasis nasofaríngea se caracteriza porque: después de unos minutos a media de haber comido las víceras contaminadas hay un malestar de comezón en la garganta, que después se puede extender a los oídos. Puede haber marcada congestión adematosa de la mucosa buco-faríngea, tonsilas, laringe, conductos de Eustaquio, fosas nasales, conjuntiva y labios. Son comunes las descargas nasales y lagrimal, estornudos y episodios de tos. Es común encontrar disnea, disfagia, disfonía y dolor en la parte frontal de la cabeza, menos común es la fotofobia y exoftalmia. Khouri reporta que el vómito es común dando un síntoma de alivio y muchos pacientes arrojan "pequeños gusanos vivos" en el vómito. Las complicaciones pueden ser por abscesos en los canales auditivos y papulosis facial y a veces cianosis. Una vez eliminando el parásito la persona restablece rápidamente (15,24,27, 29, 32).

Diagnóstico:

En el hospedador definitivo se basa en descubrimiento de los huevos el flujo nasal (método inseguro), en las heces o al estornudar los animales, pudiendo ser lanzados los parásitos se localizan por lo general en la porción posterior del tramo medio de las fosas nasales en el perro. Los huevos son elípticos miden de 70 a 90 micras y son larvados (13, 25).

Posee una delicada membrana externa gruesa, amarillenta.

En conjunto tiene color rojizo alrededor de la membrana del huevo

que es bastante gruesa hay una cavidad llena de líquido incoloro y limitada por una fina pared.

como la segunda membrana es muy pegajosa, no dan resultado las técnicas de concentración de los huevos en superficie. Debido a las características que presentan los huevos; el diagnóstico coproparasitológico se realiza de la siguiente manera: para separar la membrana adherida, Enigk y Düwel recomiendan tratar previamente la muestra con una solución al 5% de hidróxido de potasio (en proporción 1:10). Al cabo de tres a seis horas de reposo se mezcla el sedimento, con agua por tres veces consecutivas de jando reposar en cada una de las lavadas. Seguidamente se toman tres tubos de centrifuga y en cada uno se ponen dos milímetros del sedimento, cubriendo luego con silicato potasio y centrifugando varios minutos y se procede a investigar 3 gotas de la superficie de los tubos (13,25).

En el hospedador intermediario el diagnóstico también puede ser en forma accidental en la necropsia o por la detección de las ninfas calcificadas por medio de rayos X (17).

Recientemente han sido propuestas técnicas inmunológicas como precipitación in vitro, reacciones de sensibilidad cutánea en animales de experimentación como el conejo y la hemaglutinación indirecta motivo del presente estudio (17,25).

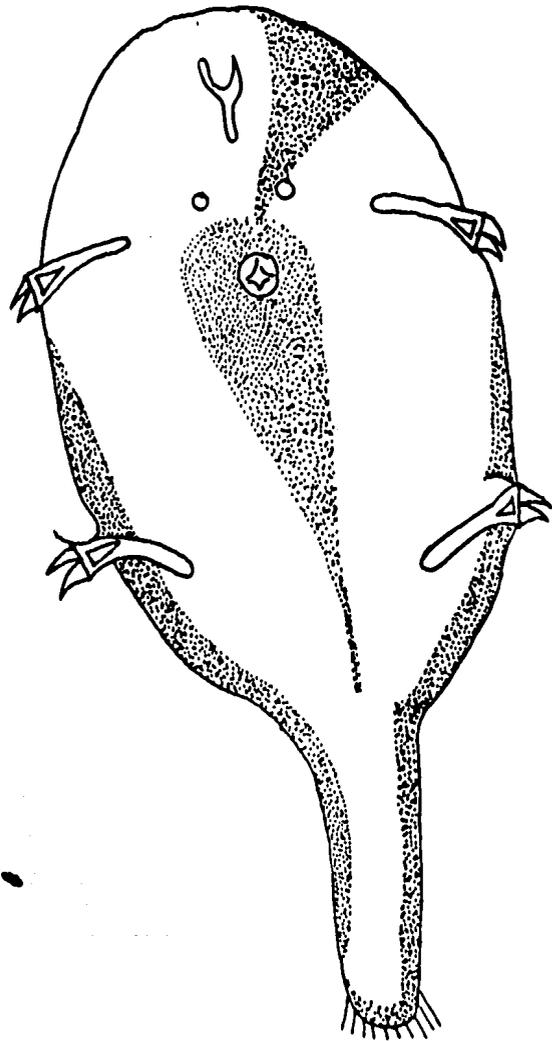
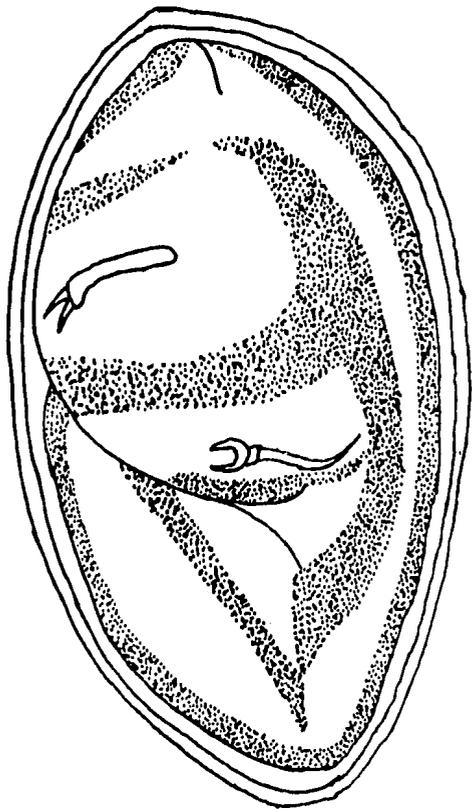
Tratamiento:

No hay tratamiento para la linguatuliasis que sea efectivo pues el caso de las ninfas puede ser por eliminación directa de éstas con ayuda de anestésicos locales para facilitar la eliminación y disminuir la irritación del hospedador y el otro es un

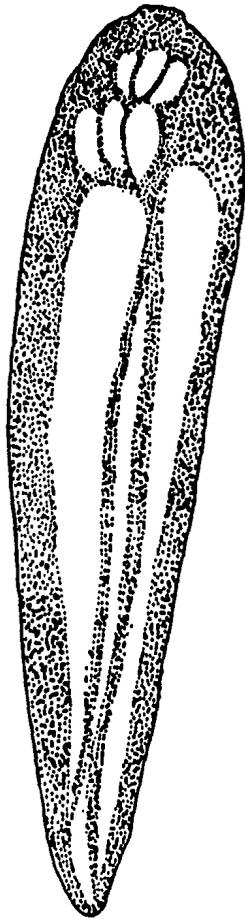
tratamiento sintomático por medio de la administración de antihelmínticos para disminuir la sensibilidad del hospedador (Wats0 et al 1956) (25).

Prevención:

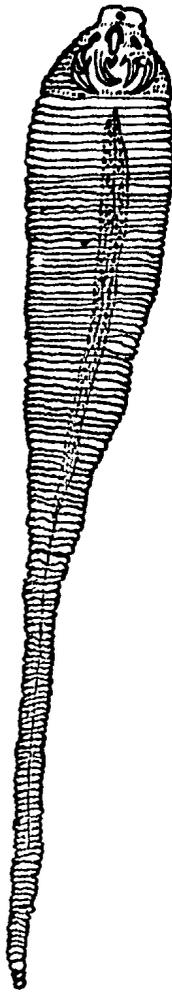
Para establecer un control eficaz sobre la linguatuliasis es importante tener una idea clara de la historia natural y completa de la enfermedad y determinar entonces el lugar o lugares donde las barreras que se establezcan contra ella pueden ser más efectivas. Por lo cual debe darse difusión a las autoridades sanitarias sobre la presencia del parásito en las víceras que se consumen rutinariamente tanto el humano como los animales (perros y gatos etc.) en forma cruda o mal cocida lo que representan un peligro para estos y para la continuación fácil del ciclo biológico del parásito, ya que se han encontrado las ninfas del parásito después que ha pasado la inspección de las autoridades sanitarias (31,32,33).



LINGUATULA SERRATADA.
HUEVO EMBRIONARIO Y
EMBRION ACARIFORME.



LINGUATULA SERRATADA.
NIFA Y ADULTO.



O B J E T I V O S

- .- Preparación de antígeno completo de este parásito a partir de ninfas colectadas de vísceras de ovinos y caprinos para posterior aplicación en la detección de anticuerpos contra este pentastómido.

- .- Establecer una prueba inmunológica para determinar la presencia de *Linguatula serrata* y así contribuir al estudio de esta parasitosis, aplicando esta prueba a las distintas especies que ataca.

- .- Observar la respuesta inmunológica que ocasiona in vivo el antígeno completo de ninfas de *Linguatula serrata* por medio de la inoculación subcutánea en ovinos.

MATERIAL Y METODOS

Material de laboratorio:

El comunmente empleado en un laboratorio clínico.

Material biológico:

- .- Se utilizaron pulmones e hígado de 30 ovinos y 35 caprinos machos adultos jóvenes parasitados con ninfas de *Linguatula serrata*, que fueron donados por el rastro Ferrería y Tlanepantla.
- .- El suero control positivo se obtuvo de un ovino macho adulto joven donado por el rastro de Tlanepantla que estaba parasitado con ninfas de *Linguatula serrata*, se comprobó la existencia de estas ninfas después de ser sacrificado y examinar sus vísceras, dicho suero tenía un título de 1:1024.
- .- Para inducir inmunidad contra este parásito, se inocularon 2 ovinos machos adultos joven clínicamente sano que se utilizó para obtener el suero control negativo.
- .- Se emplearon eritrocitos de carnero obtenidos por punción yugular de un ovino macho adulto joven sano y se conservaron en solución Alsever durante una semana.
- .- Se utilizaron eritrocitos de humano grupo "O", tipificado mediante antígenos comerciales.

Métodos:

.- Preparación de antígeno:

Se utilizó una digestión artificial de los pulmones e hígado

de los caprinos y ovinos parásitados, utilizando jugo gástrico artificial (5ml. de HCl -6 de pepsina de la droguería Cosmopolita) obteniéndose aproximadamente 800 ninfas de *Linguatula serrata*, las cuales fueron maceradas con 2 ml. de solución salina obtenido se guardó en alícuotas de 1 ml. a 4°C.

.- Tratamiento de sueros.

Todos los sueros empleados deben ser calentados a 56°C por 30 minutos, con el fin de inactivar el complemento. Posteriormente se absorben con un volumen igual de la suspensión de eritrocitos de carnero el 20% en solución salina fisiológica (0.9%) durante una hora a 37°C con agitación suave; esto se realiza con el objeto de eliminar la presencia de anticuerpos inespecíficos.

.- Los sueros problema se obtienen inaculando 2 ovinos clínicamente sanos por vía subcutánea con el antígeno completo de acuerdo al siguiente protocolo (fig. No. 2) que se encuentra en la página siguiente.

.- Suspensión de eritrocitos de carnero al 2% 10 ml. de eritrocitos que se encuentran en solución. Al server se lavan tres veces con solución salina fisiológica (0.9%) centrifugando durante 5 minutos a 2000 v p.m. finalmente se ajusta a una concentración al 2% con solución salina fisiológica (0.9%).

Protocolo de Inmunización.

Inoculación	Tiempo día	Dosis.
1	1	
2	8	1ml. de Ag. + 1ml. adyuvante incompleto de Freund (mezcla de aceite mineral con detergente)
3	16	1ml. de Ag. + 1ml. adyuvante incompleto de Freund (mezcla de aceite mineral con detergente + M. bovis).
4	24	1ml. de Ag + 1ml. de adyuvante completo de Freund (Arlacel-Drakeol 1:9 + M. bovis).

fig. 2 se inoculó 1 ml. de Antígeno (extracto total crudo de un macerado de ninfas de *Linguatulaserrata*), por vía subcutánea bajo diferentes condiciones.

NOTA:

Se sangraron a los 30 días después de la primera inoculación.

I.- Sensibilización de eritrocitos con ácido tánico

- Se obtuvieron eritrocitos de carnero realizando una punción yugular y se conservaron durante una semana en un volumen igual de solución de Alsever, que contiene:

Glucosa	20.5	gr.
Ácido cítrico monohidratado	0.55	gr.
Citrato de sodio dihidratado	8.0	gr.
Cloruro de sodio	4.2	gr.
Agua destilada	1000.0	ml.

A pH 6.1, se esterilizó por filtración y se guardó en refrigeración a 4 °C.

- Se preparó una solución stock de ácido tánico 1:1000 en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, al momento de emplearse se hizo una dilución 1:20,000.
- Se tomaron 20 ml de eritrocitos que se encontraban en solución Alsever se lavaron tres veces con (PBS) pH 7.2 y se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante cinco minutos cada vez y finalmente se ajustaron a una suspensión de 2.5% en PBS pH 7.2.
- Se agrega un volumen igual de ácido tánico 1:20,000 en PBS pH 7.2 (37).

.- Se incubó la mezcla en baño María a 37°C durante 15 minutos decantando en seguida el sobrenadante y resuspendiendo en PBS pH 7.2 se repitió tres veces el procedimiento, ajustando finalmente a una concentración de 2.5% en PBS pH 7.2.

II.- Sensibilización de eritrocitos con el antígeno.

.- 10 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados con ácido tánico al 2.5% se mezcló con 10 ml de la dilución óptima del antígeno (32 y 33) en PBS pH 6.4 e incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

.- Se mezclaron 5 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados con ácido tánico al 2,5% con 5 ml de diluyente (suero normal de conejo (S.N.C.) al 1% en solución salina fisiológica 0.9%, SSF - SON), y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

.- Ambas mezclas se lavaron 3 veces con diluyente ajustando finalmente a una concentración de 1.5% en PBS pH 6.4.

III.- Sensibilización de eritrocitos de humano con Cloruro de Cromo (CrCl_3).

- .- Para sensibilizar los eritrocitos de humano, se tomaron 15ml de sangre humana grupo "O" positivo y se lavaron tres veces con solución salina fisiológica (0.9%), a 2000 r.p.m. durante 5 minutos cada vez.
- .- Por cada ml de eritrocitos ya lavados se agregaron 2 ml de la dilución óptima de antígeno (ver pág. 32), mezclando con agitación fuerte.
- .- En seguida se agregó gota a gota 2 ml de solución fresca de CrCl_3 al 0,1% en SSF (0.9 %), sin dejar de agitar y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
- .- Posteriormente se lavaron los eritrocitos 4 veces con solución salina fisiológica, a 2000 r.p.m. durante cinco minutos cada vez, ajustando finalmente a una concentración de 0.5 % en solución salina amortiguadora de trietanolamina (TBS) pH 7.4.

IV.- Para obtener la dilución óptima de antígeno se procede de acuerdo al siguiente esquema.

Eritrocitos al 2.5% sensibilizados con ácido ténico	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
5 ml de dilución de antígeno	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Incubar 30 min. a temperatura ambiente Lavar tres veces con SSF-SUN. Ajustar a 1.5% con PBS pH 6.4.					

Titulación del antígeno.

Cada una de las diluciones se checkaron con los controles positivo y negativo y se escogió la más baja dilución de antígeno que dió el título más elevado con el suero inane y no reaccionó con el suero negativo considerandose como la concentración óptima de antígeno.

Nota:

Otro método para determinar la concentración óptima de ag. para llevar a cabo la reacción de Hemaglutinación indirecta es

por medio de la cuantificación de proteínas. Existen métodos turbidimétricos para determinar proteínas que emplean ácido tricloroacético, ácido tungstico o ácido sulfosalísilico pero su sensibilidad es baja(mg.) (14).

La purificación de proteínas requiere de un método rápido y sensible, para la cuantificación de proteínas, el método de Lowry puede tener un error muy grande debido a que puede haber interferencia por diversos compuestos(EDTA, carbohidratos, tris, etc.); la reacción de Biuret también puede alterarse por sustancias como tris, amonio y glicerol. La modificación de estos ensayos para eliminar estos inconvenientes presenta problemas (5).

El método de Azul de Coomassie es un método muy sensible y rápido para determinar microgramos de proteínas utilizando el principio de enlace de colorante a la proteína (5).

Los métodos de que disponíamos eran poco sensibles(reactivo de Biuret y precipitación con ácido sulfosalísilico), por lo cual decidimos trabajar con el antígeno total realizando diluciones hasta encontrar la dilución óptima.

PROCEDIMIENTO PARA LA HEMAGLUTINACION INDIRECTA(PASIVA)

- .- Preparar diluciones del suero problema de la siguiente manera. En una gradilla colocar 10 tubos debidamente numerados, agregarles 0.5 ml de SSP-SCN al 1% ó TBS según el caso.

- .- Agregar 0.5 ml del suero problema al tubo uno mezclar bien con la misma pipeta y transferir 0.5 ml al tubo dos. Continuar de la misma manera con el resto de los demás tubos.

- .- Adicionar 0.5 ml de eritrocitos al 1.5% sensibilizados con ácido tánico ó CrCl_3 según el caso, a cada una de las diluciones.

- .- Para cada suero problema se incluyen tres testigos que se preparan de la forma siguiente.
TESTIGO DEL SUERO (Tubo 11).
Mezclar 0.5 ml del suero problema sin diluir con 0.5 ml de eritrocitos no sensibilizados.
TESTIGO DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS (Tubo 12).
Mezclar 0.5 ml de SSP-SCN ó TBS con 0.5 ml de eritrocitos sensibilizados.

TESTIGO POSITIVO (Tubo 13).

Mezclar 0.5 ml de suero problema no diluido con 0.5 ml de eritrocitos sensibilizados.

Agitar todos los tubos e incubar a 37°C en baño María durante 60 minutos.

El título del suero será la máxima dilución a la cual se o tenga hemaglutinación.

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en la titulación del antígeno indican que la dilución óptima es de 1:40 debido a que fué la menor dilución con la que se obtuvo el título más elevado con el suero inmune (control positivo) y no reaccionó con el suero negativo.

Los resultados obtenidos en la prueba de Hemaglutinación Indirecta utilizando eritrocitos de carnero sensibilizados con ácido tánico se muestran en las tablas 1 y 2. El título de anticuerpos en el suero uno es de 1:512.

Tubo	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Dilu ción del suero	uno	1:2	1:4	1:8	1:16				1:512	TS	TE	TP	
Resul tado	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	+-	-	-	4+

Tabla No. 1

Hemaglutinación Indirecta empleando eritrocitos de carnero sensibilizados con ácido tánico.

El título de anticuerpos en el suero nos fué de 1:1024.

Tubo	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Dilu ción del suero	1:2	1:4	1:8	1:16					1:1024				
										TS	TE	TP	
resul tado	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	4+

Tabla No. 2

Hemaglutinación Indirecta empleando eritrocitos de carnero sensibilizados con ácido tánico

Los resultados obtenidos en la prueba de Hemaglutinación Indirecta empleando eritrocitos de humano sensibilizados con Cloruro de Cromo se muestran en las tablas 3 y 4. El título de anticuerpos en el suero uno es de 1:128.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Dilución del suero uno	1:2	1:4	1:8	1:16			1:128				TS	TE	TP
Resultado	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-	-	-	-	4+

Tabla No. 3

Hemaglutinación Indirecta empleando eritrocitos de humano sensibilizados con Cloruro de Cromo.

El título de anticuerpos en el suero dos fue de 1:512.

Tubo	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Dilu ción del suero	dos 1:2	1:4	1:8	1:16				1:512		TS	TE	TP	
Resul tado	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-	4+

Tabla No 4

Hemaglutinación Indirecta empleando eritrocitos de humano sensibilizados con Cloruro de Cromo.

Nota:

- 4+ - máximo de aglutinación
- - no aglutinación
- TS - testigo del suero
- TE - testigo de eritrocitos
- TP - testigo positivo

D I S C U S S I O N E S

La aglutinación es una reacción inmunológica que se efectúa cuando se combinan antígenos particulados con anticuerpos específicos, y puede ser directa o indirecta y realizarse en micro o macrotécnica.

La reacción de Hemaglutinación Indirecta requiere de la sensibilización de eritrocitos para lo cual en este trabajo se emplearon ácido tánico y Cloruro de Cromo. En ambos casos obtuvimos resultados positivos; sin embargo existe una diferencia en cuanto a sensibilidad de la técnica ya que en el caso de el tratamiento con ácido tánico se detectan menores cantidades de anticuerpos que utilizando eritrocitos tratados con Cloruro de Cromo. La diferencia de sensibilidad puede deberse a que el tratamiento con ácido tánico se ha practicado tanto en la rutina hospitalaria como a nivel investigación (Boyde 1951, Kess y col. 1961), por lo que los pequeños detalles se han ido modificando en comparación con la de Cloruro de Cromo que casi no se emplea.

Existe una desventaja en lo que se refiere a el tiempo para montar la técnica empleando eritrocitos sensibilizados con ácido tánico, pues la preparación de los reactivos es más delicada y el tiempo para realizarla es mayor que el que necesita cuando se emplean eritrocitos tratados con Cloruro de Cromo.

Se considera que el parásito tiene una elevada antigenicidad, pues se pudo observar, que activa rápidamente el sistema inmunológico del hospedador lo cual se comprueba con el título de anticuerpos detectados en ambos sueros trabajados.

La hemaglutinación Indirecta tiene una gran importan-

cia, pues se ha comprobado (38) su alta sensibilidad cuando se utilizan antígenos específicos bien estandarizados. Debe hacerse notar que en el caso de otras parasitosis tales como, cisticercosis, ascariasis, toxocariasis y fasciolosis, debido a lo complejo que es preparar los antígenos puros y bien estandarizados, los resultados dejan mucho que desear, sin embargo se sigue trabajando de tal manera que en un futuro próximo seguramente se contará con antígenos adecuados (16, 21). Para el caso de Linguatula serrata, motivo de este estudio, se considera que se obtuvo un antígeno adecuado para emplearse en la determinación de Hemaglutinación Indirecta ya que, aunque su preparación es un poco tediosa principalmente por la recolección de las ninfas, éste es estable hasta dos meses (periodo máximo empleado en éste estudio) o quizás más ya que se mantiene en congelación a menos de 4°C en alícuotas de 1 ml. lo que permitía trabajar con un procedimiento adecuado estandarizado.

Los reportes publicados acerca de la frecuencia de las fases adultas y ninfales de Linguatula serrata en ovinos y caprinos así como en otros animales domésticos como en el perro, nos dan una idea de la situación en la que se encuentra el hombre con respecto a este parásito por lo que Linguatula serrata tiene una importancia a nivel de salud pública ya que esta parasitosis puede pasar desapercibida y aun confundirse con otras entidades patológicas.

Debe señalarse la importancia que tiene el estudio de Linguatula serrata más a fondo en nuestro país, así como la determinación e importancia del problema en los animales

y en el hombre mediante el desarrollo de medidas diagnósticas y preventivas, y establecer la probable presencia del parásito en las vísceras que se consumen rutinariamente crudas o mal cocidas.

C O N C L U S I O N S

- .- Linguatula serrata es un parásito que tiene una elevada antigenicidad ya que activa rápidamente el sistema inmunológico del hospedador lo cual se comprueba por el título de anticuerpos detectados en los sueros.

- .- La preparación del antígeno empleado en la prueba de Hemaglutinación Indirecta es un poco laboriosa principalmente por la recolección de las ninfas, sin embargo se obtuvo un antígeno adecuado que es estable manteniéndose en congelación a menos de 4^oC en alícuotas de 1 ml.

- .- El tratamiento de eritrocitos con ácido tánico en este trabajo confiere una mayor sensibilidad a la reacción de Hemaglutinación Indirecta

- .- Los objetivos planteados al inicio del trabajo se cumplieron en su totalidad ya que contribuimos a una técnica que puede ser aplicada para el diagnóstico de la linguatulirosis en las diferentes especies que afecta.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez V., Presencia de Linguatula serrata (Fröelich 1789) en Dusycion culpaesus y formas niniales en Octodon d. degus y Abrocoma b. benetti, Bol. Chile Parast., 15:2,22,1960.
- 2.- Azar J.E., An unsuccessful trial on production of parasitic pharyngitis (Halzoun) in human volunteers, Am. J. Trop. Med. Hyg., 13:562-83, 1964.
- 3.- Baraboglia E., L.E.J., Presencia de un ejemplar adulto de Linguatula serrata (Fröelich 1789) en Felis catus domesticus, Gaceta Vet., Buenos Aires, 30:12, 251-55, 1968.
- 4.- Barret J.T., Inmunología, primera edición, Ed. Interamericana México 1970.
- 5.- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding analytical biochemistry, 72:248-254, 1970.
- 6.- Diagi F.F., Enfermedades Parasitarias, segunda edición. La Prensa Médica Mexicana 1970.
- 7.- Boyden S.U., The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by an triprotein serum, J. Exp. Med., 93:107-20, 1951.
- 8.- Brown H.W., Parasitología Clínica Básica, cuarta edición, Ed. Interamericana S.A., 1975.
- 9.- Cannon D.A., Linguatulid infestation in man, Ann. Trop. Med. Parasit., 30:100-07, 1959.
- 10.- Carroll F.E., F.R.P., G.J.R., Parasitología Clínica, primera edición, Salvat editores S.A., Barcelona España, 1974.
- 11.- Colombo G.F., L.M.S., Parasitismo humano por Linguatula serrata (Fröelich 1789), comprobación en Argentina, Rev. Cub. Med. Trop., 15:13, 51-53, 1967.
- 12.- Cruz R.A., Frecuencia de algunos helmintos parásitos de perro (Canis familiaris) del D.F., Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 33-42 1971.

- 13.- Chandler A.C., R.C.P., Introducción a la Parasitología, traducción de la decima edición, Funciones Omega S.A., Casanova Barcelona, 1968.
- 14.- Davidsohn I., H.J.B., Diagnostico Clínico para el laboratorio, sexta edición, Ed. Salvat 1979.
- 15.- Fain A., The pentastomida parasitic in man, ann.Soc.Belg.Med. Trop., 55:1, 59-64, 1975.
- 16.- Fudenberg H.H., Manual de Inmunología Clínica, cuarta edición Buenos Aires Argentina, 1960.
- 17.- Flynn R.J., Parasites of laboratory Animals, primera edición The Iowa State University Press A., 1973.
- 18.- Frobisher E., F. R., Microbiología, Decimo tercera edición Ed. Interamericana 1970.
- 19.- Galia M.K., Linguatula serrata (Pentastomida), parasitizing Humans and animals in Egypt, Neighbouring countries, and El-sewher, J. of the Egyptian public Health association, XLII; 6, 363-69, 1972.
- 20.- Galo S.P., Elementos de Parasitología Médica, segunda edición México D.F., Tomo III, 1944.
- 21.- Gordon B.L., F.D.K., lo esencial de la Inmunología, segunda edición, Ed. El manual moderno, Buenos Aires Argentina 1979.
- 22.- Ibañez N. Linguatula serrata formas larvarias en gato domestico, Bol.Chile Parasit., 24:3, 160-162, 1969.
- 23.- Inigo C.P., Parasitología, primera edición, H, blue, Ediciones Barcelona España, 1970.
- 24.- Jay R.G., Parasitology for Veterinarians, Third edition, W.O. Sanders Company London, 1980.
- 25.- Khalil G.M., J.F.S., Linguatula serrata in relation to Halzoun and the marrara syndrome, Am.J.Trop.Med.Hyg., 14:5 736-46, 1965.
- 26.- Krishna L.K., P.O.P., A pathological study on the larval

- forms of Linguatula serrata (Frölich 1789) infection goats
Indian Vet.J., 50: 317-18, 1973.
- 27.- Lapage G. Veterinary parasitology, segunda edición en inglés
traducido en London Oliver and Bey, 1971.
- 28.- Mishell S., Select Methods in Cellular Immunology Ed. W.M.
Freeman and Company U.S.A., 1980.
- 29.- Nemmeseri L., H.F., Diagnóstico Parasitológico Veterinario,
primera edición ediciones en lengua española, Ed. Acribia-Za
ragosa España 1985.
- 30.- Noel R.R., F.R.B., Methods in Immunodiagnosis., segunda edición
Ed. Wiley Medical U.S.A 1980.
- 31.- Feckarki G.D., Tratado de Parasitología, primera edición, Ed.
Aguilar Madrid, 1968.
- 32.- Rendtorff R.C., W.K.K., The occurrence of Linguatula serrata a
pentastomied within the human eye, Am.J. Trop. Med. Hyg.,
11: 702-04, 1962.
- 33.- Schacher J.F. and A.F.F., Primer hallazgo de Linguatula se-
rata en México, Rev. Inv. Salud Pub. (Méx.), 26: 3, 279-81
1966.
- 34.- Schacher J.F. and N.B.I., The etiology of halzoum in Libanon
recovery of Linguatula serrata nymphs from two patients,
Tr. n. Soc. Trop. Med. Hyg., 03: 0, 054-58. 1969.
- 35.- Schmidt G., Foundations parasitology, primera edición, The C.U.
Company, 1977.
- 36.- Weir D.M. Block, Well, Handbook of Experimental Immunology
vol. I, Scientific publication Great Britain 1978.

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y METODOS	25
SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS	
CON ACIDO TANICO	29
SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS	
CON CLORURO DE CROMO	31
PROCEDIMIENTO PARA LA HEMAGLUTINACION	
INDIRECTA(PASIVA)	34
RESULTADOS	36
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	47