



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO DE COPROANTÍGENOS DE
*Fasciola hepatica***

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN MEDICINA VETERINARIA
Y PRODUCCION ANIMAL**

PRESENTA:

M.V.Z. AURELIO CABAÑAS HERNÁNDEZ

**CO-DIRECTORES DE TESIS:
DR. ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA
DRA. KARINA HERNÁNDEZ GUZMÁN**

**ASESORES:
DR. PEDRO MOLINA MENDOZA
DR. JAIME OLIVARES PÉREZ**

TECAMACHALCO, PUEBLA 2016

CONTENIDO

Tema	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
Ciclo biológico	1
Prevalencia de la fasciolosis en México	2
Diagnóstico de la fasciolosis	3
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS	9
Área de estudio, razas de cabras y colecta de muestras	9
Productos de excreción/secreción (E/S) de <i>F. hepatica</i> adulta	10
Controles positivos y negativos analizados por ELISA y técnica de sedimentación	10
Detección de coproantígenos utilizando un ELISA sándwich con un anticuerpo monoclonal (AcMo)	11
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	14
Sensibilidad, especificidad y valor de corte del ELISA	14
Prevalencia de la infección por <i>F. hepatica</i>	15
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	20

DEDICATORIAS

Marco Aurelio Cabañas Luna

A ti hijo mío que eres el motor de mi vida que es por ti el deseo de superarme con la finalidad de ser mejor y que todo esfuerzo que realizo día a día es pensando en ti y en tu madre. Por aquellos momentos que no pudimos compartir al 100% es aquí donde todos esos momentos quedan plasmados.

A MIS PADRES

Roberto Cabañas Cabañas y Dolores Hernández Santiago

Por enseñarme a salir adelante, que por muy duro que sea el camino siempre habrá el motivo para caminarlo.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por brindarme la vida, el deseo y el amor a esta carrera tan humilde y bella.

A MI ESCUELA

“Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia”

Por acogerme entre sus brazos y enseñarme las herramientas para desarrollarme profesionalmente.

A MIS MAESTROS

Por compartir su conocimiento, para desarrollar las habilidades en la resolución de las problemáticas que la misma sociedad nos demande en nuestro ámbito profesional, en especial a: DR. ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA, DRA. KARINA HERNÁNDEZ GUZMAN, DR PEDRO MOLINA MENDOZA; por el apoyo y asesoramiento en el desarrollo de esta investigación, que gracias al apoyo brindado se ha podido finalizar este proceso.

A MIS AMIGOS

Ana Isabel Solís Delgado, María Belem López Ramos, Mariel Rosas Vivanco, Julio Cesar Urrea Castro, Julio Cesar Zarate Jiménez, Marco Antonio Yllescas Santos Jesús Jacobo Ortiz de la Cruz.

A ellos con los que construimos una gran amistad durante esta maestría uniéndonos como familia y apoyándonos como un gran equipo.

Este estudio fue financiado por el Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior (PRODEP) y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-VIMA-NAT-16-I).

RESUMEN

La enfermedad parasitaria conocida como fasciolosis es causada por *Fasciola hepatica* en animales en pastoreo y humanos; es la causante de grandes pérdidas económicas en la industria ganadera y un serio problema de salud en algunos países. La selección de una prueba diagnóstica específica es esencial para estimar la verdadera prevalencia del parásito y lograr un control efectivo. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de fasciolosis caprina, infectada naturalmente en la región Mixteca de México, mediante un ensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA) para detectar coproantígenos. Se analizaron un total de 1,070 muestras fecales utilizando un ELISA empleando productos de excreción/secreción (E/S) como antígeno. Se observó una prevalencia de *F. hepatica* en cabras de la Mixteca del 77.20% utilizando el ELISA de coproantígenos. La sensibilidad y especificidad diagnóstica del ELISA fueron 93.1% y 97.8%, respectivamente. El ELISA fue útil para demostrar el estado actual de la infección por *F. hepatica* en las zonas endémicas, y puede emplearse en estudios sobre epidemiología, así como en tratamientos antihelmínticos para prevenir pérdidas económicas y el riesgo de transmisión a humanos.

Palabras clave: Prevalencia; *Fasciola hepatica*; Cabras; Mixteca; Transhumancia; ELISA, Coproantígenos

ABSTRACT

Fasciolosis or liver fluke disease is caused by *Fasciola hepatica* in grazing animals and humans; is the cause of huge economic losses in the livestock industry and is a serious health problem in some countries. Selection of a specific diagnostic test is central for the estimation of true parasite prevalence and effective control. The objective of present study was to determine the prevalence of natural caprine fasciolosis in the Mixteca region of Mexico using coproantigen ELISA tests. A total of 1070 fecal samples were analyzed for coproantigens; using ELISA with E/S products as antigen. A prevalence of 77.20% was found using the coproantigen ELISA. The diagnostic sensitivity and specificity for the coproantigen ELISA were 93.1 % and 97.8 %, respectively. ELISA was useful for demonstrating the current status of *F. hepatica* infection in the endemic areas, and can be employed in studies on epidemiology as well as antihelmintics treatment to preventing economic loss and the risk of transmission to humans.

Keywords: Prevalence; *Fasciola hepatica*; Goats; Mixteca; Transhumance; ELISA, Coproantigens

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a diversas especies de animales de interés zootécnico: ovinos, bovinos, caprinos; animales silvestres: venados, liebres, elefantes e inclusive al humano. La enfermedad también es conocida con nombres como Distomatosis hepática, palomilla o conchuela de hígado, hígado podrido, mal de botella, acucuyachi (Quiroz, 1986).

Algunos de los problemas ocasionados por la fasciolosis en el hospedador son los trastornos digestivos y de nutrición; como el parásito adulto se alimenta de sangre puede ocasionar anemia en el hospedador; el trematodo también se alimenta de la bilis, lo cual origina que los alimentos no se digieran correctamente (síndrome de mala digestión) como resultado el animal tiene una baja producción en ganancia de peso, producción de leche, retardo en el crecimiento, trastornos reproductivos así como predisposición a enfermedades (Bautista y García 1993).

Ciclo biológico

Fasciola hepatica es un trematodo de la subclase digenea, lo que significa que tiene generaciones parasitarias asexuales y sexuales; las generaciones asexuales se encuentran en los moluscos mientras que las sexuales en los animales vertebrados (Bowman, 2014).

El parásito adulto produce huevos en la semana 10-12 pos-infección cuando el trematodo ya está establecido en los conductos biliares del rumiante y ha alcanzado la madurez sexual. Después los huevos llegan al lumen del intestino junto con la bilis, enseguida salen al exterior con las heces. Sí en el ambiente se tiene la temperatura $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y

el huevo cae en el agua, se desarrolla una larva ciliada llamada miracidio que tiene que nadar hasta encontrar un caracol del género *Lymnaea truncatula* donde se desarrollan los esporocistos además de 1 a 2 generaciones de redias. La segunda generación de redias produce las cercarías que abandonan las redias para migrar a distancias cortas para enquistarse en plantas o en el nivel del agua, esta es la etapa infectante que será consumida por el mamífero (Bowman, 2014).

Posteriormente la metacercaria viaja por el tracto digestivo donde queda expuesta a una temperatura elevada, CO₂, enzimas digestivas que le ayudarán a desenquistarse; la adolescaria atraviesa el intestino delgado para llegar a la cavidad abdominal donde buscará el hígado para migrar a través de este órgano y llegar a los conductos biliares (Bowman, 2014).

Prevalencia de la fasciolosis en México

El trematodo está presente en 29 de los 31 Estados de la República Mexicana, sin embargo su frecuencia varía de una región a otra, debido a la presencia del hospedador intermediario: los caracoles de los géneros *Limnaea*, *Fossaria*, *Galva* y *Pseudosuccinea* (Munguía, 2010).

Los estudios realizados por Quiroz (1986), mostraron que Tabasco y Veracruz tienen una prevalencia mayor del 10%, mientras que el Estado de México, Oaxaca y Chiapas presentan entre 1 a 10% de prevalencia, los estados menos afectados son Guanajuato, Michoacán, San Luis Potosí, Querétaro, Chihuahua, Zacatecas y Sonora con menos del 1%. Actualmente se considera que en todo el país existen informes de *F. hepatica* con diversas

prevalencias, excepto en Yucatán debido al tipo de suelo calcáreo (Rangel y Martínez, 1994).

En estudios realizados en los Rastros de Inspección Federal (TIF) se encontró que en Baja California Norte (Sánchez, 1982) se decomisaron el 2.01% de hígados infectados con el trematodo, mientras que en Chihuahua el decomiso fue de 1.11%, y en Saltillo Coahuila de 1.08%. Cabe mencionar que en el estado de Sonora los porcentajes de prevalencia variaron entre 0.23% del Rastro de Sonora, 17.7% en Cajeme así como de 18.6% en el rastro municipal de Cd. Obregón (Munguía, 2010).

Con base en los datos antes mencionados se observa que la prevalencia de fasciolosis es variable, debido a la presencia de los hábitats primarios o secundarios de los caracoles. En el primer caso, la infección puede ocurrir durante todo el año como se observa en las zonas costeras del Golfo de México; mientras que en el segundo caso, las zonas se limitan al altiplano donde la temperatura es mayor a 10°C (Quiroz, 1986). Una situación similar a los hábitats secundarios de caracoles, son las áreas de riego como se tienen en las costas del Noroeste del Pacífico Mexicano, donde se genera un microclima que permite el desarrollo del ciclo biológico del trematodo.

Diagnóstico de la fasciolosis

El diagnóstico clásico de la fasciolosis en ganado es la detección de huevos del trematodo a través del método de sedimentación; aunque la especificidad de este método es alta (100%) y la detección de huevos indica una infección activa tiene la desventaja de tener una baja sensibilidad en particular en heces de bovino (30-70% dependiendo del método y área de estudio). Se ha buscado mejorar la técnica antes mencionada mediante la

concentración de los huevos del parásito, Happich y Boray (1969) lo lograron al realizar de forma sucesiva, la técnica de flotación, sedimentación y el tamiz (Revisado por Toledo y Fried, 2014).

Otro método clave para evaluar la intensidad de la infección es el examen post-mortem de los animales que han sucumbido o que han sido seleccionados de un rebaño. Las lesiones que se observan en la fase aguda de la infección son exudado fibrinoso en la capsula hepática, sangrado, destrucción de tejido e inflamación (Marcet-Sánchez *et al.*, 2012). Más tarde durante la infección se observa reparación de tejido o atrofia con tumefacción en algunos lóbulos del hígado; en la fase crónica los parásitos adultos se encuentran en la vía biliar principal, ocasionando inflamación, hiperplasia biliar y fibrosis en la periferia de los conductos; cuando la intensidad de la infección es alta se ha observado oclusión de los conductos biliares así como la reducción del flujo de la bilis (Marcet Sanchez *et al.*, 2012).

La necesidad de diagnosticar la fasciolosis en una etapa temprana, ha generado otras metodologías; desde inicios del siglo veinte se comenzó a utilizar la dermoreacción con el extracto somático del trematodo, sin embargo los resultados no siempre fueron confiables debido a la reacción cruzada con otros parásitos (Soulsby, 1954).

Posteriormente la detección de anticuerpos específicos contra antígenos de parásitos en el suero de animales infectados fue más común:

a) Fijación del complemento, utilizada por Benex *et al.* 1959 en ovinos observó que un resultado negativo seguro excluía la presencia de la enfermedad pero una reacción positiva no significaba que el parásito estuviera presente.

b) Inmunoelectroforesis, en 1963 Teodorovic *et al.*, encontraron una reacción de precipitación, característica de la cadena ligera de la inmunoglobulina gamma (γ). El

suero era de un paciente con fasciolosis, para evitar reacciones cruzadas, maceraron metacercarias del trematodo de esta forma simplificaron el patrón de precipitados.

c) Reacción de precipitación; Korach y Benex (1966) produjeron a través de una técnica físico-química una fracción de una lipoproteína, la cual es antigénica en conejos y solo produce una precipitación en la prueba de difusión en gel. Sin embargo los sueros de ovinos y humanos con fasciolosis, solo reaccionaron en la prueba de fijación del complemento con la lipoproteína cuando presentaron títulos altos de anticuerpos.

d) Hemaglutinación, Levieux *et al.*, (1992) utilizaron un antígeno específico y purificado de *F. hepatica* f2; los terneros infectados con el trematodo fueron detectados entre las semanas 2 a 4 pos-infección (SPI).

e) Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el inmunodiagnóstico de fasciolosis ha sido mejorado por el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas que emplean el extracto crudo del trematodo adulto o productos de excreción-secreción para la detección de anticuerpos en suero o leche (Molloy *et al.*, 2005; Bloemhoff *et al.*, 2015).

Algunas variantes del ELISA son:

1. ELISA indirecta, fue descrita por Engvall y Perlman en 1971. La prueba detecta anticuerpos anti-fasciola desde la segunda semana pos-infección, a través de la presencia de anticuerpos IgG del parásito en su estado juvenil.

2. DIG-ELISA, el ensayo inmunoabsorbente de Difusión en Gel ligado a enzimas es un método sencillo para la cuantificación de anticuerpos que difunden a través del gel en las placas de Petri. La reacción antígeno-anticuerpo se visualiza con peroxidasa de rábano específicos de la clase anti-inmunoglobulinas conjugadas (Arriaga y Bautista, 1997).

3. DOT-ELISA o ELISA en mancha, es una técnica que se puede aplicar en campo debido a que no requiere instrumentos costosos. El antígeno es depositado en una matriz sólida (membrana de nitrocelulosa) y se incuba en presencia de anticuerpos específicos, seguido de un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, la reacción se revela añadiendo el sustrato de la misma (Cervantes-Landín *et al.*, 2014).

4. ELISA directo, el método directo permite la detección del antígeno con un anticuerpo específico conjugado con una enzima como sistema de marcaje (Mezo *et al.*, 2004).

Otro método que se está implementando es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) esta herramienta permite detectar el ADN del trematodo, Alba *et al.*, (2015) desarrollaron un PCR multiplex para detectar *F. hepatica* en *Galba cubensis* el hospedador intermediario. El ensayo fue capaz de detectar un miracidio en el molusco, obteniendo el 100% de especificidad y sensibilidad.

En el cuadro 1, se presentan las ventajas y desventajas de las diferentes pruebas de diagnóstico:

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de las diferentes pruebas de diagnóstico para *Fasciola hepatica*

<i>Prueba</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>	<i>Detección después de la infección</i>	<i>Discrimina una infección vigente</i>
<i>Detección de huevos</i>	Económico	Baja sensibilidad	Desde la 8 SPI	Si
<i>Detección de anticuerpos en suero</i>		Reacción cruzada. No tiene correlación con la carga parasitaria.	Desde la 2 SPI	No
<i>Detección de anticuerpos en leche</i>	Fácil de realizar Estima pérdidas debido a la infección/ exposición al parásito	Reacción cruzada		No
<i>Detección de antígeno en suero</i>	Correlación positiva con carga parasitaria	Solo detecta estadios que migran a través del hígado.	Desde la 2 SPI	Si
<i>Detección de antígenos en heces</i>	Correlación positiva con carga parasitaria		Desde la 4 SPI	Si
<i>PCR</i>	Alta sensibilidad y especificidad			Si, solo cuando el parásito adulto está presente.

SPI = semana pos-infección

Tomado de Álvarez *et al.*, 2014

HIPÓTESIS

Las cabras de la Región Mixteca de México tienen una alta prevalencia de fasciolosis

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de *Fasciola hepatica* detectando coproantígenos en heces utilizando un ELISA de sándwich en cabras de la Región Mixteca de México

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener productos de excreción/secreción del parásito adulto para comprobar la positividad o negatividad de muestras de suero por ELISA, así como por la técnica de sedimentación en muestras de heces

Colectar muestras de heces de cabras en la Región Mixteca de México

Detectar coproantígenos en heces utilizando un ELISA de sándwich con un anticuerpo monoclonal anti-*Fasciola hepatica*

MATERIAL Y METÓDOS

Área de estudio, razas de cabras y colecta de muestras

La región Mixteca incluye partes de tres estados del sur de México: 1) la parte occidental de Oaxaca; 2) la frontera oriental de Guerrero; y 3) el sur de Puebla. La mixteca se divide en tres subregiones: la Mixteca Alta se encuentra entre las otras dos subregiones (Baja y de la Costa); es una región alta, templada, zonas montañosas frías y pequeños valles. La Mixteca Baja se refiere a regiones áridas en elevaciones bajas del norte de la Mixteca Alta y se extiende hacia el norte en Puebla. La Mixteca de la Costa cubre desde la Costa del Pacífico a las montañas del norte de la región de la Mixteca Alta. La región Mixteca de México cuenta con una gran diversidad de especies de árboles y arbustos que se convierten en importantes recursos forrajeros consumidos por cabras trashumantes.

La cabra criolla es una raza dominante usada para la producción de carne en la región Mixteca. Otras razas como Boer, Nubia, Alpina y sus cruzas han demostrado un considerable mérito genético para mejorar las características de crecimiento, sobre todo en condiciones de manejo extensivo.

Los productores compran las cabras que pastan en las costas de Guerrero y Oaxaca, y se transportan a las tierras de pastoreo en la Mixteca (mayo a noviembre); posteriormente, las cabras de engorda se envían a Tehuacán entre octubre y noviembre (otoño de 2014). Se colectaron 1,070 muestras de heces de cabras y se transportaron al laboratorio de Genética y reproducción de la FMVZ-BUAP. Los eluatos fecales se prepararon mediante la adición de 4 ml de amortiguador de fosfatos salinos/Tween 20 al 0.05% (v / v) (PBS-T) a 1 g de heces frescas en un tubo de centrífuga. La mezcla fue homogenizada y centrifugada a 900 g

durante 5 min y posteriormente se colectó el sobrenadante, el cual fue guardado a -80 °C hasta su uso.

Las hembras y machos castrados fueron engordados bajo un sistema de producción extensivo, por lo general con el pastoreo trashumante. Las cabras pastan en altitudes altas durante la época de lluvias y se mueven a una altitud baja climas fríos, en busca de una mejor disponibilidad de forrajes y condiciones meteorológicas. Los rebaños grandes pastan en tierras comunales rentadas.

Productos de excreción/secreción (E/S) de *F. hepatica* adulta

Se utilizaron parásitos adultos de origen caprino que fueron adquiridas de estudios previos (Villa-Mancera *et al.*, 2014). Los productos de E/S de *Fasciola hepatica* se obtuvieron mediante la incubación de parásitos adultos durante 16 horas a 37 °C en medio RPMI-1640 suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 mg/ml). El sobrenadante fue removido y centrifugado a 14,000 g durante 30 min a 4 °C. Los productos de E/S productos fueron trasferidos y concentrados en tubos para centrifugado con filtro de membrana de 10-kDa (Amicon Ultra-15, Millipore, USA) y almacenados en fracciones a -80 °C.

Controles positivos y negativos analizados por ELISA y técnica de sedimentación

Cuatro caprinos de menos de un año de edad recibieron diferentes dosis de *F. hepatica* (250 y 300 metacercarias de un cultivo de caracoles *Lymnea cubensis*), que funcionaron como control positivo. La presencia de huevos de los parásitos en muestras fecales se realizó mediante la técnica de sedimentación. El control negativo fue obtenido de cabras que no fueron expuestas al parásito (muestras fecales). Se comprobó la presencia del parásito en cabras infectadas utilizando un kit comercial que emplea un ELISA (DRG International Inc, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante para detectar anticuerpos contra productos de E/S de *F. hepatica*.

Detección de coproantígenos utilizando un ELISA sándwich con un anticuerpo monoclonal (AcMo)

El AcMo ES-78 (amablemente donado por el Dr. Jorge Sarracent, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba). La concentración óptima del MoAb para revestir las placas de ELISA se determinó por titulación de tablero de ajedrez utilizando muestras de heces positivas y negativas. Para cada paso, se añadieron 100 µl por pozo a menos que se indique lo contrario. Las placas fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4 °C con el AcMo (10 µg/ml en PBS). Después de cuatro lavados con PBS-T, los sitios inespecíficos se bloquearon con 200 µl de albumina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-T por 1 h a 37 °C. Los eluatos fecales sin diluir fueron adicionados y las placas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h. Después de lavar los pozos como se describe anteriormente, se adicionó IgG

anti-productos de E/S de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución de 1:2500) en PBS-BSA al 1%. Las microplacas se incubaron durante 1 h a 37 °C y posteriormente se lavaron con PBS-T. El color de la reacción fue desarrollada mediante la adición de 100 µl por pozo de sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma USA). La reacción enzima-sustrato se paró con 50 µl de H₂SO₄ 4 N. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx800).

Análisis estadístico

La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un animal enfermo, es decir, la probabilidad de que para un animal enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. Mientras que la especificidad, es la probabilidad de clasificar correctamente a un animal sano, en otras palabras, la probabilidad de que para un animal sano se obtenga un resultado negativo. El valor predictivo positivo (VPPos), se define como la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba. Por otro lado, el valor predictivo negativo (VPNeg), es la probabilidad de que un animal con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. La sensibilidad y especificidad diagnóstica, VPPos y VPNeg fueron calculados de acuerdo a Fletcher *et al.*, 2012, mediante las siguientes fórmulas matemáticas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Muestras Verdaderas Positivas}}{\text{Muestras Verdaderas Positivas} + \text{Muestras Falsas Negativas}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Muestras Verdaderas Negativas}}{\text{Muestras Verdaderas Negativas} + \text{Muestras Falsas Positivas}}$$

$$VP_{Pos} = \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}}{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia} + ((1 - \text{Especificidad}) \times (1 - \text{Prevalencia}))}$$

$$VP_{Neg} = \frac{(\text{Especificidad} \times (1 - \text{Prevalencia}))}{((1 - \text{Sensibilidad}) \times \text{Prevalencia}) + ((\text{Especificidad}) \times (1 - \text{Prevalencia}))}$$

Un valor de p superior a 0.05 se consideró no significativo y menos de 0.01 fue considerado altamente significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA) para Windows.

RESULTADOS

Sensibilidad, especificidad y valor de corte del ELISA

La sensibilidad y especificidad diagnóstica óptima, y valor de corte se calcularon utilizando el estándar de oro de las heces (Cuadro 2). Para el ELISA de coproantígenos, el valor de corte para un resultado positivo se definió en 0.5. Para la prueba, se observó una sensibilidad del 93.1% y una especificidad del 97.8%. El ensayo enzimático mostro un alto valor predictivo positivo (porcentaje de cabras con resultados positivos en la prueba con fasciolosis) del 99.3%, mientras que para los valores predictivos negativos (porcentaje de cabras con resultados negativos en la prueba con fasciolosis) fue de 80.7%.

Cuadro 2. Evaluación de los valores diagnósticos para detectar productos de E/S en heces.

	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo	Valor predictivo
	(%)	(%)	positivo (%)	negativo (%)
ELISA de coproantígenos	93.1	97.8	99.3	80.7

Prevalencia de la infección por *F. hepatica*

La prevalencia de la infección por *F. hepatica* en la región Mixteca de Mexico, obtenida mediante un ELISA de coproantígenos fue de 77.20% (826/1070) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Prevalencia de la infección por *F. hepatica* en cabras de la región Mixteca de México mediante un ELISA de coproantígenos (n = 1070).

	Número de muestras positivas	Prevalencia (%)
Coproantígenos (95% IC)	826	77.20 (1.05–1.15)

IC = Intervalo de confianza

DISCUSIÓN

Las técnicas parasitológicas tradicionales utilizadas para el diagnóstico de infecciones por *Fasciola hepatica*, se basan generalmente en la detección de huevos de parásitos en las heces, pero la producción de huevos del trematodo huevo es intermitente e irregular y no detecta estados inmaduros de parásito. La copromicroscopia es relativamente poco fiable y emplea mano de obra para llevarse a cabo. La detección de coproantígenos utilizando un ELISA de sándwich es una prueba rápida, fácil y sensible en comparación con el conteo de huevos de *Fasciola hepatica* en heces (Moustafa *et al.*, 1998). El diagnóstico serológico por ELISA es la técnica más sensible y barata para detectar fasciolosis, detectando la infección tempranamente (Reichel, 2002; Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

En este estudio, se empleó un ELISA tipo sándwich basado en AcMo para la detección de productos de E/S circulantes (antígenos no glicosilados de 14, 24, 26 y 51 kDa) en muestras de heces. Además, la sensibilidad y especificidad del ELISA basado en AcMo ES-78 en heces fue de 93.1% y 97.8% respectivamente. Se han detectado coproantígenos a partir de las 4 SPI en ovinos usando un ELISA de sándwich basado en AcMo (Dumenigo *et al.*, 2000). Los antígenos de E/S en heces de ovinos infectados experimentalmente pueden ser detectados a partir de la 4 SPI, con una sensibilidad del 93.3% (Almazan *et al.*, 2001). Los productos de E/S de *F. hepatica* reconocidos por anticuerpos en sueros de cabras infectadas pueden ser detectados a partir de las 2 SPI (Martínez-Moreno *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 1996).

El presente estudio, es el primer informe en la región Mixteca de México, en el que se desarrolló y utilizó un ELISA para la detección de coproantígenos para determinar la prevalencia de la infección. Se registró una prevalencia alta de la infección al detectar

coproantígenos mediante un ELISA de sándwich del 77.20%. Una prevalencia del 43.0% fue detectada utilizando un ELISA indirecto en cabras en una zona semidesértica en el noroeste de México (Munguía-Xochihua *et al.*, 2007). En cabras Galega del noroeste de España, se encontró una seroprevalencia del 227% usando un ELISA de captura (el antígeno MM3 contiene catepsinas L1 y L2 y una proteína de tipo Kunitz) (Pérez-Creo *et al.*, 2016). En Pakistán se ha reportado una prevalencia de la infección en cabras del 4.08% y 49.36%, utilizando un kit de ELISA disponible en el mercado (DRG, Alemania) (Afshan *et al.*, 2013; Anjum *et al.*, 2015). Durante la última década la prevalencia de la infección por *F. hepatica* se ha incrementado, en parte debido al cambio climático, el aumento de los desplazamientos de animales y los cambios en las prácticas agrícolas (Van Dijk *et al.*, 2010). Otras causas incluyen la edad, sexo, raza, manejo y protocolos que se utilizan para el tratamiento de la fasciolosis (Khan *et al.*, 2013). El número actual de animales y humanos infectados probablemente sea mucho mayor debido a su naturaleza asintomática, la limitada disponibilidad de herramientas de diagnóstico, y la falta de información sistemática o coordinada de infecciones, especialmente en los países subdesarrollados (Toet *et al.*, 2014)

La presencia de coproantígenos indica una infección por *F. hepatica*, mientras que la serología indicaría una exposición reciente. Se ha encontrado una correlación significativa entre la presencia de coproantígenos, la producción de huevos y la intensidad de la infección en ovinos (Almazan *et al.*, 2001; Dumenigo *et al.*, 2000), y en bovinos (Abdel-Rahman *et al.*, 1998; Brockwell *et al.*, 2013).

Las infecciones parasitarias son abundantes en ciertas estaciones, teniendo una profunda influencia en los patrones de migración de los grupos trashumantes (distancia recorrida, número de movimientos, duración de las estancias en cada lugar y dirección del movimiento cuando cambia la estación), lo que restringe su tiempo en áreas de pastoreo

favorables, pero con efectos desfavorables relacionados a la permanencia en áreas con la enfermedad (Macpherson, 1995; Xiao et al, 2015). La infección está presente en zonas con características de suelo y climáticas adecuadas para el establecimiento en el huésped intermediario de *F. hepatica* que se transmite principalmente por los caracoles de la familia Lymnaeidae, los cuales son frecuentes en México (Cruz-Mendoza *et al.*, 2011).

Las cabras son compradas en la costa de Guerrero y Oaxaca, las cuales se van mezclando en el rebaño durante un periodo de pastoreo largo, infectándose de parásitos de varias granjas y lugares. Los animales interactúan con la fauna silvestre en las áreas de pastoreo y en puntos donde beben agua la mayor parte del año, la fasciolosis afecta a una amplia gama de mamíferos (Issia *et al.*, 2009). La trashumancia con cabras ha disminuido fuertemente y rápidamente en nuestra área de estudio en los últimos años, y actualmente esta actividad tiende a preferir el confinamiento de los animales al interior. Hoy en día, la población rural está disminuyendo en México debido a la migración a los Estados Unidos e incluso aquellos que permanecen en el sector de la producción de carne de cabra son renuentes a practicar la trashumancia.

CONCLUSIÓN

Estos datos mostraron que al utilizar un anticuerpo monoclonal, la fascioliasis caprina puede ser diagnosticada (sensibilidad $\geq 86.7\%$ y una especificidad $\geq 96.4\%$) en el período prepatente para disminuir su impacto negativo sobre el crecimiento y la productividad, previniendo pérdidas económica y el riesgo de transmisión a los seres humanos. Son necesarios otros estudios enfocados a identificar los factores ambientales y el manejo del pastoreo serán necesarios para el establecimiento de una estrategia de control eficiente de *F. hepatica*.

BIBLIOGRAFÍA

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. *Am J Vet Res.* 1998; 59:533-537.

Afshan K, Valero MA, Qayyum M, Peixoto RV, Magraner A, Mas-Coma S. Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *J Helminthol.* 2014; 88:417-426.

Alba A, Vázquez AA, Hernández H, Sánchez J, Marcet R, Figueredo M, Sarracent J, Fraga J. A multiplex PCR for the detection of *Fasciola hepatica* in the intermediate snail host *Galba cubensis*. *Vet Parasitol.* 2015; 211:195-200.

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. *Vet Parasitol.* 2001; 97:101-112.

Anjum R, Khan MN, Sajid MS, Javed MT. 2015. Evaluation of commercial ELISA kit for diagnosis of small ruminant Fascioliasis in Pakistan. *Pak J Agri Sci.* 2015; 52:183-189.

Arriaga DC., Bautista GC. Revisión bibliográfica sobre el diagnóstico serológico de algunas helmitiasis en rumiantes. *Téc. Pecu.Méx.* 1997; 35:105-113.

Benex J, Lamy L, Gledel J. Complement-fixation test for liver flukes in sheep. *Bull Soc. Pathol. Exot.* 1959; 83-87.

Bloemhoff Y, Forbes A, Danaher M, Good B, Morgan E, Mulcahy G, Sekiya M, Sayers R. Determining the Prevalence and Seasonality of *Fasciola hepatica* in Pasture-

based Dairy herds in Ireland using a Bulk Tank Milk ELISA. *Ir Vet J.* 2015; 68:16.

Bowman D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. Elsevier Health Sciences. St. Louis, Missouri. 2014.

Brockwell YM, Spithill TW, Anderson GR, Grillo V, Sangster NC. Comparative kinetics of serological and coproantigen ELISA and faecal egg count in cattle experimentally infected with *Fasciola hepatica* and following treatment with triclabendazole. *Vet Parasitol.* 2013; 196:417-426.

Cervantes-Landín AY, Martínez-Martínez I, Reyes PA, Shabib M, Espinoza-Gutiérrez B. Standardization of Dot-ELISA for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, compared to ELISA and Western blot. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 32:363-368.

Cruz-Mendoza I, Quiroz-Romero H, Correa D, Gómez-Espinoza G. Transmission dynamics of *Fasciola hepatica* in the Plateau Region of Mexico. Effect of weather and treatment of mammals under current farm management. *Vet Parasitol.* 2011; 175:73-79.

Duménigo BE, Espino AM, Finlay CM, Mezo M. Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 2000; 89:153-161.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971; 8:871-874.

Fletcher, R.H., Fletcher, S.W., Fletcher, G.S. *Clinical epidemiology: the essentials*. Lippincott Williams & Wilkins. 2012.

Happich FA, Boray JC. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica*

infection in sheep. Aust Vet J. 1969; 45:326-328.

Khan MK, Sajid MS, Riaz H, Ahmad NE, He L, Shahzad M, Hussain A, Khan MN, Iqbal Z, Zhao J. The global burden of fasciolosis in domestic animals with an outlook on the contribution of new approaches for diagnosis and control. Parasitol. Res. 2013; 112:2421-2430.

Korach S, Bénex J. A lipoprotein antigen in *Fasciola hepatica*. II. Immunological and immunochemical properties. Exp Parasitol. 1966; 19:199-205.

Levieux D, Levieux A, Mage C, Venien A. Early immunodiagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2 in a passive hemagglutination test. Vet Parasitol. 1992; 44:77-86.

Marcet- Sánchez R, Figueredo Pino M, Núñez Fernández CF, Rojas Rivero CL, Sarracent Pérez CJ. Increase of analytical sensitivity of FasciDIG system for the diagnosis of *Fasciola hepatica*. Rev Cubana Med Trop. 2012; 64:335-341.

Martínez A, Martínez-Cruz MS, Martínez FJ, Gutierrez PN, Hernández S. Detection of antibodies of *Fasciola hepatica* excretory--secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. Vet Parasitol. 1996; 62:247-252.

Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Gutiérrez PN, Becerra C, Hernández S. Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. Parasitol Res. 1997; 83:680-686.

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). J Parasitol. 2004; 90:845-852.

Moustafa NE, Hegab MH, Hassan MM. Role of ELISA in early detection of *Fasciola copro-antigens* in experimentally infected animals. *J Egypt Soc Parasitol.* 1998; 28:379-387.

Munguía XJA. Capítulo VIII, Impacto económico de la fasciolosis en México. En: *Fasciolosis, Estudios de la Fasciolosis en México de 1879 a 2006.* Editado por Héctor Quiroz Romero y Juan Antonio Figueroa Castillo. FMVZ-UNAM 2010.

Munguía-Xóchihua JA, Ibarra-Velarde F, Ducoing-Watty A, Montenegro-Cristino N, Quiroz-Romero H. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitol Res.* 2007; 101:127-130.

Pérez-Creo A, Díaz P, López C, Béjar JP, Martínez-Sernández V, Panadero R, Díez-Baños P, Ubeira FM, Morrondo P. *Fasciola hepatica* in goats from north-western Spain: Risk factor analysis using a capture ELISA. *Vet J.* 2016; 208:104-105.

Quiroz RH. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.* El Manual Moderno. México (D.F.), 1986.

Rangel RLJ, Martínez DE. Pérdidas económicas de decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco. *Vet. Méx.* 1994; 25:327-331.

Reichel MP. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet Parasitol.* 2002; 107:65-72.

Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez J, Panadero R, Díez-Baños P, Morrondo P. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of

natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol.* 2000; 93:39-46.

Soulsby EJ. Skin hypersensitivity in cattle infested with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol.* 1954; 64:267-274.

Teodorovic, D. Diagnosis of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in human beings by means of immunoelectrophoresis. *Nature.* 1963; 198, 204.

Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int J Parasitol.* 2014; 44:915-927.

Toledo R, Fried B. *Digenetic trematodes* 2014, Vol. 766. Springer.

Van Dijk, J., Sargison, N. D., Kenyon, F., & Skuce, P. J. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. *Animal.* 2010; 4:377-392.

Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, Carreón-Luna L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol Res.* 2014; 113:243-250.