

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE
FASCIOSIS EN BOVINOS, OVINOS Y HUMANOS**

RAÚL FERNANDO SIERRA BALCÁRCEL

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2014

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE
FASCIOSIS EN BOVINOS, OVINOS Y HUMANOS**

Investigador

RAÚL FERNANDO SIERRA BALCÁRCEL

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al el título de
MAGÍSTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Tutor

Dr. NELSON URIBE DELAGADO

Línea de epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades causadas por
Trematodos

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMEDICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron involucradas en este proceso, que de una u otra forma han aportaron en mi formación

A Nelson Uribe Delgado, por su dirección y apoyo en la realización de este trabajo.
A Oscar Noya y su equipo de trabajo de la Universidad Central de Venezuela, por la colaboración brindada en todo el proceso.

A los compañeros del Laboratorio Central de Investigaciones de la Universidad Industrial de Santander, por la compañía y valiosa colaboración.

Al Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad Industrial de Santander, por haber facilitado mis desplazamientos permanentes para mi formación.

A mi familia, en especial a mi madre, y a mis amigos cercanos que estuvieron para darme el apoyo emocional y espiritual que necesite, gracias a Dios por colocarlos en mi camino; entendiendo que el mejor lugar donde puedo estar en el centro de su voluntad.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	19
2. CICLO BIOLÓGICO	24
3. EL PARÁSITO	27
4. RESPUESTA INMUNE	29
4.1 RESPUESTA HUMORAL	29
4.2 RESPUESTA CELULAR	30
4.3 RESPUESTA INMUNE Y EVASIÓN DEL PARÁSITO	31
5. SÍNTOMAS CLÍNICOS	34
5.1 CASOS EN HUMANOS	34
5.1.1 Forma aguda	34
5.1.1.1 La aguda típica	35
5.1.1.2 La aguda atípica	35
5.1.1.3 La ectópica	35
5.1.2 Forma crónica	35
5.1.2.1 La sintomática	35
5.1.2.2 La asintomática	35
5.2 CASOS VETERINARIOS	36
5.2.1 Los síntomas generales en los animales	37
5.2.2 Durante la sub-aguda	37
5.2.3 En la fase crónica	37

6. DIAGNÓSTICO	38
6.1 DIAGNÓSTICO DIRECTO	38
6.2 DIAGNÓSTICO INDIRECTO	39
7. OBJETIVOS	42
7.1 OBJETIVO GENERAL	42
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
8. METODOLOGÍA	43
8.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ELISA INDIRECTA PARA BOVINO, OVINOS Y HUMANOS	44
8.1.1 Preparación de reactivos	44
8.1.2 Obtención del Ag E/S Fh	44
8.1.3 Medición de la concentración de proteínas del Ag E/S	45
8.1.4 Se filtró el producto del mantenimiento de los vermes	45
8.1.5 Parte del preparado antigénico se concentró y purificó	45
8.1.6 Medición de la concentración de proteínas	45
8.2 ESQUEMA GENERAL REALIZADO	46
8.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
8.4 APLICACIÓN DE LA PRUEBA	51
8.5 NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS	51
9. ASPECTOS ÉTICOS	52
10. RESULTADOS OBTENIDOS	54
10.1 RESULTADOS DEL WESTERN BLOT	66
10.2 RESULTADOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA	68
11. DISCUSIÓN	69

12. CONCLUSIONES	75
FINANCIACIÓN	77
REFERENCIAS	78
BIBLIOGRAFIA	89
ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura No 1. Fotografías en diferentes estadios del parásito	28
Figura No 2. Esquema general pre- ELISA.	46
Figura No 3. Procedimiento general para la técnica de Western Blot.	50
Figura No 4. Productos del Ag E/S Fh sometidos a diferentes procesos una vez recolectados de la incubación, corridos en electroforesis con gel de poliacrilamida al 12%. (*PM: peso molecular en KDa)	55
Figura No 5. Cuadro comparativo entre diferentes bloqueadores usados para ELISA, discriminación de controles positivos y negativos.	56
Figura No 6. A). Cuadro comparativo para las diluciones del anti IgG, discriminación de controles positivos y negativos. B). diluciones probadas para el substrato revelador de la reacción.	56
Figura No 7. Absorbancias de los sueros de bovinos	57
Figura No 8. Absorbancias de los sueros de ovinos	58
Figura No 9. Absorbancias de los sueros de humanos	59
Figura No. 10. Curva ROC (sueros de bovinos).	60
Figura No. 11. Curva ROC (sueros de ovinos).	61
Figura No. 12. Curva ROC (sueros de humanos).	62
Figura No 13. Reacción cruzada para las tres especies con antígeno E/S Fh (programa estadístico SPSS).	63
Figura No. 14. Consolidado comparativo de serología con coprología de la aplicación del ELISA para Fasciolosis a una población del municipio de San Andrés de la provincia García Rovira del departamento de Santander.	66

Figura No 15. Patrón de bandas del Western Blot específica de cada especie para confirmar e identificar un caso de Fasciolosis.

67

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla No 1. Características clínicas de la infección crónica por Fasciola hepática en niños	36
Tabla No 2. Determinación de Sensibilidad y Especificidad en los bovinos. S del 100% (24/24) y E del 96.2% (26/27).	64
Tabla No 3. Determinación de Sensibilidad y Especificidad en los ovinos. S del 100% (25/25) y E del 92% (23/25).	64
Tabla No 4. Determinación de Sensibilidad y Especificidad en los humanos. S del 100% (6/6) y especificidad del 100% (33/33).	65
Tabla No 5. Tabla resumen de la positividad encontrada en el municipio de San Andrés, Santander - Colombia	65

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Consentimiento Informado (Toma de Muestras Animales)	100
Anexo B. Consentimiento Informado (Toma de Muestras Humanos)	103
Anexo C. Protocolo para la Toma de Muestra Sanguínea en Bovinos y Ovinos	106
Anexo C.1. Protocolo para la Toma de Muestra Coprológica en Bovinos y Ovinos	109
Anexo C.2. Protocolo Toma de Muestra Sanguínea para Personas Residentes en las Fincas Muestreadas	110
Anexo D. Informe de Resultados.	113
Anexo E. Preparación de Reactivos	114
Anexo F. Protocolo de Obtención de Antígeno Excretor/Secretor (E/S) de <i>Fasciola hepática</i>	117
Anexo G. Método de Bradford Fundamento	120
Anexo H.	122
Anexo I. Estandarización de la Técnica de Elisa para Fasciolosis Animal (Bovina y Ovina)	123
Anexo J. Estandarización de la Técnica de Elisa para Fasciolosis Humana.	125

RESUMEN

Título: ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE FASCIOSIS EN BOVINOS, OVINOS Y HUMANOS*

Autor: RAÚL FERNANDO SIERRA BALCÁRCEL**

Palabras Clave: ELISA para fasciolosis, fasciolosis humana, fasciolosis ovina-bovina, Western blot

Descripción:

La Fasciolosis es una enfermedad que afecta a humanos y animales, causada por los trematodos *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*, el primero es un parásito cosmopolita que se distribuye en climas fríos, templados y subtropicales, mientras que *F. gigantica* se halla en climas tropicales. Esta enfermedad y/o la infestación se presentan en zonas donde las condiciones requeridas para la supervivencia y la multiplicación del hospedero intermediario se cumplen y existe relación con el hospedero definitivo y el parásito. El molusco *Lymnaea sp* (hospedero intermediario) se puede encontrar invadiendo prados, abrevaderos y otras zonas húmedas.

La utilización de métodos inmunológicos para establecer el diagnóstico de Fasciolosis se justifica entre otras razones por la baja sensibilidad de los exámenes coprológicos en animales y humanos.

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una de las pruebas más utilizadas y la sensibilidad y especificidad dependen fundamentalmente de la calidad de los antígenos empleados; de ahí la importancia de seleccionar rigurosamente el antígeno. Los productos de Excreción - Secreción (E/S) de vermes adultos de *F. hepatica* son considerados potentes inductores de la respuesta inmune humoral, superando a los antígenos somáticos, sin embargo, cuando los antígenos de Excreción Secreción (E/S) se utilizan en ELISA se han observado falsos positivos hasta de un 30%.

Se ha escogido la implementación de la técnica de ELISA en el laboratorio como acercamiento a la situación real de esta problemática en el departamento de Santander. El inmunodiagnóstico presenta algunas limitaciones en cuanto a la especificidad; sin embargo en los laboratorios en donde ha sido estandarizado presenta buenos niveles de sensibilidad, (la sensibilidad y especificidad fueron del 100% y 96,9%, 100% y 85,1% y 96% y 96,1% para humanos, ovinos y bovinos, respectivamente) esto se pudo conseguir con la metodología utilizada en el laboratorio lo que permitió tener acceso a una técnica altamente confiable.

* Proyecto de Grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Facultad de Salud, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Director: Dr. Nelson Uribe Delgado.

SUMMARY

Title: ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE FASCIOSIS EN BOVINOS, OVINOS Y HUMANOS*

Author: RAÚL FERNANDO SIERRA BALCÁRCEL**

Keywords: ELISA fasciolosis, fasciolosis human, ovine-bovine fasciolosis, Western blot

Description:

Fasciolosis is a disease that affects humans and animals caused by flukes *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*, the first is a cosmopolitan parasite that is distributed in cold, temperate and subtropical climates, while *F. gigantica* is found in tropical climates. This disease and / or infestation occur in areas where the conditions for the survival and multiplication of the intermediate host and there are true regarding the definitive host and parasite. The *Lymnaea* sp (intermediate host) can be found invading mollusk meadows, troughs and other wet areas.

The use of immunological methods for the diagnosis of fasciolosis is justified for reasons including the low sensitivity of stool tests in animals and humans. Immunosorbent assay (ELISA) test is one of the most used and the sensitivity and specificity depend critically on the quality of the antigens used, hence the importance of carefully selecting the antigen. Excretion products - secretion (E / S) of adult worms of *F. hepatica* are considered potent inducers of humoral immune response, surpassing the somatic antigens, however, when antigens Secretion

Excretion (E / S) are used in ELISA false positives were observed up to 30%.

Implementation of ELISA in the laboratory as an approach to the real situation of this problem in the Santander department chose. The immunodiagnostic has some limitations in terms of specificity, but in laboratories where it has been standardized presents good levels of sensitivity (sensitivity and specificity were 100% and 96.9%, 100% and 85.1% and 96% and 96.1% for human, sheep and cattle, respectively) that could be achieved with the methodology used in the laboratory allowing access to a highly reliable technique.

* Proyect Degree.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Facultad de Salud, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Director: Dr. Nelson Uribe Delgado.

INTRODUCCIÓN

La Fasciolosis es un problema importante en la salud humana y veterinaria, con estimación de 600 millones de animales infectados en el mundo¹ y casos humanos reportados en los 5 continentes², la OMS ha estimado recientemente en 2,4 millones de personas infestadas por *F. hepática* y hasta 180 millones que están en riesgo de infestación en el futuro. Otras fuentes consideran que son 17 millones de personas que están infestadas en el mundo^{3,4}.

La Fasciolosis, es causada por parásitos de la clase de los trematodos subclase Digenea, exactamente *Fasciola hepática* y *F. gigantica*; el primero es un parásito cosmopolita que tiene su distribución en climas fríos, templados y subtropicales, mientras que *F. gigantica* se halla particularmente en climas tropicales. Esta enfermedad y/o la infestación se presentan en zonas donde las condiciones requeridas para la supervivencia y la multiplicación del hospedero intermediario se cumplen y hay relación con el hospedero definitivo y el parásito. El molusco *Lymnaea* spp (Hospedero intermediario) se puede encontrar invadiendo prados, abrevaderos y otras zonas húmedas.

F. hepática, está ampliamente distribuida en el planeta; se ha notificado infestación humana en América, Europa, Australia, África Occidental y Japón¹, es por esto que debe verse como un problema de salud pública importante². Existen prevalencias descritas para humanos en algunas regiones del mundo, “en Cuba se habían registrado más de 216 casos hasta 1990, a los cuales hay que agregarle los numerosos hallazgos posteriores”¹; 3.2% en la región interna de Porto, Portugal; 8.7% en Cajamarca y prevalencias altas como en la región de Puno y el Valle de Mantaro en Perú con 15.64% y 34.2% respectivamente⁵; 7.3% en el delta del Nilo en Egipto⁶; 10.9% en Corozal, Puerto Rico⁷; y los registros más altos que se han presentado están en los altiplanos peruanos y bolivianos con un 72% y 67% respectivamente^{8,9,10}.

Estos trematodos que en su vida adulta afectan primordialmente a bovinos, ovinos, caprinos y al humano de manera accidental¹¹ para cumplir su ciclo biológico, requieren la presencia de caracoles de la familia *Lymnaeidae*, que constituyen los hospederos intermediarios en los cuales se reproducen de manera asexual, generando formas larvales que, al madurar, salen del caracol contaminando las fuentes hídricas y por consecuencia a las zonas aledañas, la forma infectiva del parásito se alcanza cuando este llega al estadio de enquistamiento; Estas metacercarias se encuentran en el tracto gastrointestinal del hospedero que ha ingerido el alimento contaminado y dan lugar a parásitos juveniles que migran al parénquima hepático, donde permanecen hasta alcanzar la madurez sexual; una vez adultos, se localizan en los conductos biliares donde inician la reproducción sexual y comienzan a depositar huevos operculados, amarillentos y ovalados que llegan al exterior a través de las heces. La vida del trematodo adulto en el parénquima hepático y en los conductos biliares del hospedador genera graves lesiones³.

La infestación en el ser humano (hospedador accidental) se debe principalmente al consumo de agua cruda, ingestión de berros y otras hortalizas contaminadas, aunque se han reportado casos de Fasciolosis asociados al consumo de jugo de alfalfa utilizado en algunos países con fines medicinales³.

La Fasciolosis en el ámbito veterinario, mundialmente se reconoce como un problema grave, y la forma más común en la que se presenta es de carácter crónico, lo cual significa que los problemas se deben principalmente a la alta morbilidad, sin desconocer el grado de mortalidad que la misma presenta, sobre todo en ovinos; por esta razón los costos que esto representa son bastante elevados.

El diagnóstico en animales se hace generalmente por coprología, pero esta técnica presenta una sensibilidad muy baja y la mayoría de veces se logra

identificar los huevos cuando ya hay algunos efectos negativos sobre del hospedero^{12, 13}.

La enfermedad en el ganado se caracteriza por un descenso de eficiencia zootécnica, pérdida de peso del ganado (hasta un 28%), la disminución y baja calidad de la leche (hasta un 14%), disminución de lana (20-39%), diarrea intermitente, anemia y problemas de fertilidad así como posibles abortos^{14, 15}. El diagnóstico clínico es difícil, la búsqueda de huevos en materia fecal es muy laboriosa y poco sensible. La Fasciolosis aguda de los ovinos se caracteriza por anemia y a veces por mortalidad repentina, la respuesta inflamatoria del hospedador causa daños en las membranas de los hepatocitos principalmente por los radicales libres del oxígeno y derivados del óxido nítrico producidos por eosinófilos, macrófagos, y neutrófilos. Esto lleva a una disfunción bioquímica del hígado, las múltiples y fundamentales funciones de este órgano para el organismo se ven afectadas por la Fasciolosis; mientras que la crónica está acompañada de anemia, disminución del crecimiento y edemas¹⁶.

El periodo de invasión, considerado desde la ingestión de las metacercarias hasta la llegada de las formas juveniles de los vermes a los conductos biliares, es común para todos los hospedadores. El paso por las paredes del intestino delgado puede causar hemorragias e inflamación pero usualmente no son clínicamente evidentes. Las lesiones más graves son causadas durante la migración de las formas juveniles a través del parénquima hepático y al localizarse en los conductos biliares. El daño a los tejidos por donde migra el verme juvenil es causado por medios mecánicos como la abrasión que causan sus espículas y la succión por sus ventosas. Durante la migración el parénquima hepático sufre una extensa destrucción con intensas lesiones y hemorragia por la digestión de su tejido que causan los vermes inmaduros así como por la reacción inmunológica. Estas lesiones pueden llevar a procesos inflamatorios e infecciones bacterianas

secundarias que pueden desencadenar una peritonitis. También puede migrar al diafragma y a los pulmones causando lesiones, neumonía y pleuritis fibrosa³

En nuestro país esta enfermedad no tiene reportado casos humanos recientes, pero existen reportes bien definidos y claros en todos los países fronterizos, esta enfermedad se comporta de manera crónica en el hombre y no se hace evidente hasta alcanzar daños en algunas ocasiones irreversibles, alterando de manera drástica la calidad de vida del individuo; en niños puede afectar el desarrollo, integral adecuado. Se reporta un aumento gradual en las cifras de presentación de la enfermedad; tanto en el número de los países como en el número total de pacientes infectados³

El panorama frente a la Fasciolosis en nuestro país hace evidente que se necesita contar con una herramienta que pueda hacer prematuro y eficientemente el diagnóstico para humanos y animales, y así poder conocer la verdadera situación de las zonas en riesgo de nuestra región. Por esto nos hemos planteado la labor de estandarizar la técnica ELISA para Fasciolosis humana, bovina y ovina en el laboratorio y así contar con una técnica de fácil acceso y con resultados más confiables y sensible que los de coprología. En el país no existe de manera rutinaria este diagnóstico, debido a que esta enfermedad en animales es subvalorada o desmeritada incluso por los mismos productores y en humanos hace parte de la lista de enfermedades desatendidas según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este trabajo permite a la Universidad Industrial de Santander ratificar su compromiso de extensión con la comunidad, ofreciendo el servicio de diagnóstico serológico para los habitantes de las zonas rurales del departamento y a su respectivo ganado.

1. MARCO TEÓRICO

“La descripción más antigua sobre Fasciolosis está contenida en un libro titulado (Black Book of Chik) ¹⁷ publicado cerca de año 1200 y hace referencia a un verme encontrado en el hígado de una oveja. Juan de Brie en 1379 escribió un tratado sobre la producción de lana de oveja en el que hace mención de la “enfermedad del hígado podrido” en estos animales y la relaciona con el consumo de una planta la dauve (ranunculácea) y al hecho de criar vermes grandes y planos. El autor del libro, no describe su morfología y dudaba si los gusanos eran la causa o la consecuencia de la enfermedad^{18, 19}. El “gusano del hígado podrido” se describió en un libro sobre cría de animales publicado en 1523 por Anthony Fitzherber. Posteriormente, en 1549 el físico italiano Fanensi Gabucinus describe el gusano encontrado en la sangre del hígado de ovejas y cabras. Observaciones de la enfermedad del gusano del hígado fueron hechas por Conrad Gesner en 1551 quien relacionó la presencia de este gusano en los animales con la ingestión de hierba en las proximidades del agua^{20, 21}.

La Fasciolosis en el hombre es reportada por primera vez en 1760 en una necropsia hecha por Pallas. Entre finales de siglo XVIII y durante el siglo XIX se confirmaron las diferentes etapas del ciclo de vida de *F. hepática* y otros trematodos; sin embargo aclarar definitivamente el ciclo del parásito fue lento y se inició con los estudios de Adolfo Lutz entre 1892 y 1893 trabajando con *F. gigantica* e infectando cerdos, conejos, cabras y ratas. La parte final de este rompecabezas la aportó el helmintólogo ruso Dimitry Sinitsint en 1914 comprobando en conejos que las formas juveniles del gusano después del exquistamiento en el intestino delgado penetraban su pared y migraban al hígado por la cavidad peritonea^{20, 21}. (Basado en la Tesina de Uribe N.)

Hoy se conoce completamente el ciclo de este parásito; los huevos de *Fasciola hepática* eliminados en las heces se desarrollan en el agua dando origen a una

larva, el miracidio. Tras la infestación del molusco y su multiplicación en el interior de éste, hay una liberación de cercarías que se movilizan hasta fijarse a un soporte vegetal para dar la forma infestante o metacercaria. Tras la ingestión por el hospedero, la joven larva migra a través del hígado (de 8 a 10 semanas aproximadamente) hasta alcanzar los canales biliares y empieza su gestación. La infestación provoca una crisis hepática grave durante la fase migratoria (Fasciolosis aguda) después le sigue un ataque más agresivo durante la fase biliar (Fasciolosis crónica)^{22, 21}.

Una vez iniciada la ovoposición aún es difícil el diagnóstico de Fasciolosis, puesto que la excreción de huevos es intermitente y muchos casos no son diagnosticados mediante un simple examen parasitológico. Por estas razones, en estos casos el hallazgo de los huevos del parásito requiere del empleo de técnicas copro-parasitológicas de concentración^{23, 24} aun cuando es bien conocido, que la sensibilidad de estas técnicas sigue siendo baja. La búsqueda de huevos de *F. hepática*, en materia fecal, se realiza en muestras de humanos o de animales, aun que se utilizan técnicas diferentes, en humanos se ha implementado sedimentación, flotación con Merthiolate-iodine-formol (MIF, solución fijadora) y la más descrita ha sido la técnica cuantitativa de Kato-Katz. En animales, las metodologías de sedimentación rápida de Lumbreras (TSR), Faust, Sheather, han dado buenos resultados en su sensibilidad²².

Inicialmente la infestación en el hombre fue considerada como una enfermedad de poca importancia. Pero en 1990 se escribe el primer artículo en la revista de la OMS en donde se le cataloga como enfermedad de interés en salud pública. Entre 1970 y 1990 se describieron 2.500 casos en 42 países En 1995 la OMS eleva a 61 los países con casos humanos y una estimación de 17 millones de personas afectadas en todo el mundo²².

En la actualidad existen diversos mecanismos por los cuales se puede llegar a un diagnóstico serológico de Fasciolosis animal o humana, entre ellos se encuentra inmunodifusión en gel, Western Blot para confirmación, ELISA directo e indirecto²⁵ y como ramificaciones de este último, se encuentran varias metodologías que divergen en los antígenos utilizados para el reconocimiento por parte de los anticuerpos, como lo son, proteínas de antígenos somáticos/tegumento, antígenos de excreción secreción (E/S), fracciones purificadas del Ag E/S y proteínas recombinantes.

La utilización de métodos inmunológicos para establecer el diagnóstico de la Fasciolosis es justificado por la baja sensibilidad de los exámenes coprológicos en animales y humanos²³. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una de las pruebas más ampliamente usada pero su sensibilidad y especificidad dependen fundamentalmente de la calidad de los antígenos empleados; De ahí la importancia de seleccionar con la mayor rigurosidad el antígeno a utilizar. Los productos de E/S de vermes adultos de *F. hepática* son considerados potentes inductores de la respuesta inmune humoral, superando a los antígenos somáticos/tegumento en el inmunodiagnóstico, sin embargo, cuando los antígenos de E/S se utilizan en ELISA se han observado falsos positivos hasta de un 30%²⁶.

Las reacciones cruzadas en los métodos inmunoenzimáticos tienen gran relevancia ya que pueden afectar directamente la calidad de la prueba; es por esto que en un ensayo para valorar las reacciones que se presentaban con los sueros humanos y bovinos, se encontró que por ELISA, el antígeno de Excreción secreción de *F. hepática* (Ag E/S Fh) presentó un 10% de reacción cruzada con Paragonimiosis, Hidatidosis, Hymenolipiosis, Estrongyloidiosis. Otros investigadores afirman que el Ag E/S Fh puede presentar reacción cruzada con sueros de humanos o animales con Ascaridiosis, Toxocariosis, Hidatidosis, Cisticercosis entre otros. Pero por otro lado, la mayoría de los autores coinciden

en que son las proteínas de bajo peso molecular las más específicas, aquellas que se encuentran alrededor de 8 kDa²⁷.

Los productos de E/S de *F. hepática* están compuestos por algunas moléculas de naturaleza glicoproteica, según lo demuestran las determinaciones de proteínas e hidratos de carbono, que cuando son usados como antígenos en las pruebas diagnósticas reaccionan inespecíficamente con sueros humanos sin Fasciolosis, dando falsos positivos. Esto puede ser debido a reacciones cruzadas con otros helmintos o a consecuencia de posibles infestaciones pasadas, tratadas o autolimitadas²⁸. Por el contrario, otros estudios hacen indispensable el uso de esta técnica ya que algunas evidencias sugieren que los humanos no son tan susceptibles a la infestación por *F. hepática* como podría suponerse. En un estudio se suministró por vía oral una concentración conocida de metacercarias a cerdos, después de la primera semana, se obtuvo una tasa de recuperación muy baja, pudiéndose explicar este fenómeno por la reacción celular que es capaz de destruir los trematodos que pretenden entrar al hígado²⁹; comparando la capacidad enfrentar la infestación en cerdos con lo que pudieran encontrar en humanos. Un estudio en Vietnam se llevó a cabo en ganado, detectando huevos y anticuerpos contra *F. hepática*, por un método de sedimentación cuantitativa y un ensayo inmunoenzimático respectivamente. En general, el 54,9% de los animales presentaron huevos, mientras que el 72,2% eran seropositivos a Fasciolosis³⁰.

Hemos escogido la implementación de la técnica ELISA en el laboratorio como acercamiento confiable a la situación real de esta problemática en el departamento de Santander. El inmunodiagnóstico presenta algunas limitaciones en cuanto a la especificidad, en los lugares donde ha sido estandarizado presenta buenos niveles de sensibilidad y pensamos que la mejor forma de continuar el abordaje de la Fasciolosis en nuestro departamento es empleando un tamizaje lo suficientemente sensible para aproximarnos a conocer la prevalencia real de la

enfermedad tanto en humanos como en animales y del mismo modo obtener la mejor especificidad posible.

2. CICLO BIOLÓGICO

Debido a que este parásito necesita de un hospedero definitivo, principalmente herbívoros, y un molusco como hospedador intermediario, su ciclo de vida es complejo.

“El parásito adulto se localiza en los conductos biliares de su hospedador definitivo en donde pone los huevos. De los conductos biliares los huevos pasan al intestino y luego por medio de las heces al ambiente. Los huevos deben madurar durante 12 a 60 días. En las condiciones adecuadas se inicia el desarrollo de una larva ciliada. A éste estadio se le conoce como miracidio. La salida de la larva del huevo depende de la luz. Una longitud de onda de 650 nm estimula la producción de una enzima proteolítica fotoactiva que rompe la unión de la envoltura y el opérculo³¹. Los movimientos del miracidio y la hipertonia del medio en el interior del huevo facilitan su salida.

Una vez fuera del huevo, la larva debe encontrar su hospedador intermediario en un tiempo no superior a 24 horas pues sus reservas energéticas se acaban y puede morir. La velocidad del desplazamiento del miracidio en el agua es crítica: para ser considerado como viable debe desplazarse 1 cm en 4-12 segundos. Otros factores que afectan su supervivencia son la temperatura y el pH³¹. La búsqueda del hospedador está mediada por estímulos quimiotácticos. Interviene la luz, la temperatura, el pH, el oxígeno y la composición iónica entre otros.

Los ambientes propicios del molusco son las orillas de manantiales, arroyos, tierras pantanosas y áreas sujetas a inundaciones. El miracidio penetra en el molusco, pierde la cubierta ciliada transformándose en esporocisto joven que viaja por los vasos sanguíneos a los conductos linfáticos localizándose en la región peri-esofágica del caracol. A los 15 días se producen entre 5 y 8 redias, a partir de las células germinales de los esporocistos, pudiendo llegar hasta 40, cada una de

las cuales mide entre 1 y 3 mm. Tienen mayor movilidad que los esporocistos y se alimentan de tejido del hepatopáncreas y de las gónadas del caracol. Su migración por los tejidos causa bastante daño, observándose en infestaciones intensas la muerte del hospedero intermediario. De un miracidio se pueden formar 600 cercarias³¹. (Basado en la Tesina de Uribe N.)

En condiciones desfavorables de vida para el molusco, tales como escasez de alimento y temperaturas bajas se puede producir una segunda generación de redias³¹. En el cuerpo de cada redia hay células germinales que se multiplican y forman las cercarías que son el estadio larvario final.

Una vez que las cercarías salen del caracol, nadan activamente y en un periodo de algunos minutos a dos horas de su salida se fijan sobre hojas o diferentes objetos, utilizando su ventosa ventral. La cercaría se adhiere e inicia el proceso de enquistamiento; algunas hacen este proceso directamente en el agua. Este quiste es blanco e inmediatamente infeccioso para el hospedador definitivo. A los dos días es de color amarillo, oscuro y duro. Mide aproximadamente 200 µm. En este estadio el parásito puede sobrevivir más de un año en condiciones donde haya suficiente humedad y adecuadas temperaturas³².

Una hora después de la infestación, la metacercaria se exquista en el intestino delgado. Sobre el exquistamiento hay revisiones muy completas³¹. Se considera que los factores extrínsecos que afectan este proceso son: alta presión de CO₂, temperatura cercana a 39 °C, condiciones reductoras y sales biliares. Dentro de los factores intrínsecos, están las secreciones que produce el verme en el interior del quiste y sus fuertes movimientos. Dos horas después ha atravesado la pared del intestino y entrado en la cavidad abdominal, en dirección al hígado. Posteriormente, la forma juvenil del parásito, migra a través del parénquima hepático hasta localizarse definitivamente en los conductos biliares, donde tras

ocho semanas de infección alcanza su madurez sexual y elimina huevos, que junto con la bilis llegan al intestino y salen al exterior con las heces³¹.

3. EL PARÁSITO (Fisiología y morfología)

El parásito pertenece al phylum *Platyhelminthes*; clase *Digenea*, superorden *Anepiheliocytidae*, orden *Echinostomatida*, familia *Fasciolidae*, género *Fasciola* especies *F. hepática* y *F. gigantica*³³. El verme adulto es hermafrodita, tiene forma de hoja y es aplanado, se prolonga en su extremo cefálico una prominencia tronco-cónica. Posee dos ventosas musculares; una oral ubicada en la parte anterior dorsal que se continúa con una faringe corta, esófago y un tubo digestivo inicialmente bifurcado y luego muy ramificado. La ventosa ventral ubicada debajo y muy cerca de la oral pero de mayor tamaño también es llamada acetábulo²¹.

Los huevos son de forma ovalada; miden cerca de 150 μm en su diámetro mayor y entre 63 y 90 μm en el diámetro menor, son de color amarillo en su base y un matiz pardo debido a la bilis en donde son depositados por los adultos, se presenta un opérculo en uno de los polos. El número de huevos puesto por un verme adulto varía entre 2.000 y 5.000 huevos al día. La cantidad de huevos depende de la especie hospedadora, si es primo o re-infección, la carga parasitaria y la duración de la infección^{21, 31}

Figura No 1. Fotografías en diferentes estadios del parásito



El miracidio por su parte tiene una longitud cercana a los 130 μm , es ancho en su parte anterior y delgado en la posterior; la cutícula es ciliada. las cercarías son redondeadas y con una larga cola. Su cuerpo mide 250-300 μm de longitud y su cola el doble. Tienen una ventosa ventral y una oral en el centro del cuerpo como el gusano adulto³¹. La glándula vitelógena, formada por finos folículos, está situada periféricamente y también muy ramificada. Los conductos de los folículos se unen en conductos transversales que drenan en la glándula de Mehlis, la cual se comunica con el ootipo. Existen dos testículos muy ramificados cuyos conductos eferentes se reúnen y desembocan en la bolsa del cirro y el poro genital (gonoporo) que se abre en el atrio genital situado por adelante del acetábulo. (Figura No. 1)

En *F. hepática* el verme adulto tiene una longitud de 1,5 a 3 cm y 1,0 a 1,5 cm de ancho. Su cuerpo presenta un color blanquecino o gris tomando a veces un color oscuro en sus bordes debido al contenido biliar que llenan sus ciegos y a la amplia distribución en sus extremos laterales de las glándulas vitelógenas³⁴.

4. RESPUESTA INMUNE

Cada una de las partes en la relación parásito-hospedero busca colocar la balanza en su favor y para esto usa diferentes mecanismos. El tipo de respuesta ante la infestación puede variar de acuerdo al tipo de hospedero en el que se encuentre²¹.

4.1 RESPUESTA HUMORAL

En los bovinos existe respuesta principalmente de anticuerpos IgG1, con un máximo a la cuarta semana de la primo o re-infección, y una disminución posterior. Algunos autores, encuentran niveles indetectables de IgG2a³⁵. Los niveles de IgA son muy bajos o indetectables³⁶.

En conejos^{37, 38, 39} y ovinos^{40, 41} se detectan IgG desde la segunda semana y en caprinos desde la tercera semana post-infestación^{42, 43}. Los picos máximos de anticuerpos se establecen la sexta, octava y decimoprimera semana post-infestación, respectivamente, y a partir de ese momento se mantienen los niveles de anticuerpos²¹.

En ovinos se detectan IgA en suero desde la segunda semana, con un máximo a la sexta semana que se mantiene paralelamente a las IgG⁴¹. En cuanto a IgM, se encuentran niveles en la quinta semana post-infestación en ovinos⁴².

La respuesta de tipo IgE es menos intensa y menos persistente en el tiempo, mostrando dos máximos, el primero relacionado con la fase de migración por el parénquima hepático y el segundo con la llegada del parásito a los canales biliares⁴⁴.

En la fase aguda en el hombre se encuentran niveles elevados de IgM, IgG, IgE, hallándose los isotipos IgG1 e IgG4 en el 97-100% de los pacientes⁴⁵. El hallazgo de IgE específica antiparásito se encuentra en el 48-71% de los pacientes^{46, 47}. Otros estudios reportan que respuestas del tipo IgM, IgA, IgG2a e IgG3 aparecen con menores títulos⁴⁸. La detección de IgE disminuye en las semanas siguientes de instaurar un tratamiento efectivo contra *F. hepatica*⁴⁷.

4.2 RESPUESTA CELULAR

Se ha estudiado la respuesta tipo celular en los sitios que el parásito transita o se ubica: pared intestinal, peritoneo, parénquima hepático o también en las partes del organismo que reciben antígenos derivados de su presencia como son la sangre periférica, el bazo y los nódulos linfoides mesentéricos y hepáticos²¹.

En la pared intestinal de especies naturalmente resistentes en mayor proporción a *F. hepática*, como son ratas y bovinos, se halla una fuerte infiltración de la mucosa por mastocitos y eosinófilos, que aumenta en las re-infestaciones y está estrechamente relacionada con el desarrollo de inmunidad^{49, 50}. Las células peritoneales de ratas infectadas con *F. hepática* o inyectadas con Ag E/S Fh, muestran entre los días séptimo y decimocuarto, disminución de la actividad fagocitaria y aumento de IL-10 en el líquido ascítico y descenso en la producción de óxido nítrico^{51, 52}.

En el parénquima hepático los gusanos inmaduros en migración producen traumas por las lesiones formadas, se perfila una zona necrótica al paso del verme y una infiltración de macrófagos, linfocitos y granulocitos, mayoritariamente eosinófilos⁵³.

En el hígado de la rata infectada las células que mas proliferan son las mononucleares y CD4+, pero las células CD8+ se mantienen en la misma proporción. La producción de IFN γ permanece igual a las no infectadas hasta el

día séptimo post-infestación y posteriormente disminuye, mientras la producción de IL-4 e IL-10 aumenta ^{54, 55}.

En las re-infestaciones hay aumento en el número de eosinófilos, células B, CD4+ y células de tipo fibroblástico MHC clase II rodeando los trayectos. Las infestaciones crónicas se caracterizan por presentar fibrosis perilobular con predominio de CD8+ y células T; también hay infiltración linfocitaria alrededor de los huevos de *F. hepática* ^{55, 56}.

Tempranamente se encuentran los eosinófilos en sangre, desde la semana segunda a la cuarta post-infestación, asociados con niveles altos de IgE, que se mantiene en el tiempo en los bovinos³⁵, y en ovinos disminuye a la decimotercera post-infestación⁴⁰.

4.3 RESPUESTA INMUNE Y EVASIÓN DEL PARÁSITO

Uno de los trematodos más complejos que existen en cuanto a su capacidad de evasión de la respuesta inmune es *F. hepática*, como algunos otros helmintos, posee mecanismos para evadir el ataque del hospedero; tanto sus formas juveniles, como sus formas adultas, que se ubican en los conductos biliares y cuentan con estos medios.

La ubicación final en los conductos biliares de los gusanos adultos se puede interpretar como una estrategia, pues son sitios inmunológicamente inaccesibles. Sus antígenos y huevos son excretados con los jugos biliares, lo cual los protege de una eventual respuesta; los anticuerpos descienden, cuando los vermes ya se han establecido en los conductos biliares⁵⁷.

Un papel vital en la evasión del parásito al ataque inmune lo tiene el tegumento. Hay evidencias que muestran que el verme adhiere a su propio tegumento

moléculas del hospedador que “lo camuflan” de la respuesta del sistema inmune. El tegumento está formado principalmente por el glucocalix que son glucoproteínas con cadenas de oligosacáridos y gangliosidos terminando en ácido siálico⁵⁷. El glicocalix actúa en tres vías. La primera es cambiar su composición química durante las etapas de maduración y migración del gusano, lo que va alterando su antigenicidad y por lo tanto la respuesta inmune que se despierta no es la adecuada. La segunda consiste en “recambiar” el glucocalix mediante las vesículas secretoras. En la fase juvenil, éste cambio ocurre aproximadamente cada 3 horas. Esto conlleva a que las células efectoras ligadas a anticuerpos, como los eosinófilos y neutrófilos no tengan el suficiente contacto con el verme y por lo tanto no puedan establecer una buena respuesta. Y en tercer lugar, consecuencia de las anteriores, al re-cambiar el glucocalix, el sistema inmune se entretiene y se ocupa frente a lo que no va a perdurar.^{55, 57}.

Los gusanos juveniles son bastante resistentes ante el ataque directo del complemento; esto podría deberse a la presencia de los terminales de ácido siálico en las glucoproteínas, que inactivarían la vía alterna del complemento⁵⁷.

Las enzimas como: súper-óxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa (GST), están estrechamente vinculadas en los vermes jóvenes o adultos, en un mecanismo para neutralizar la toxicidad de los compuestos intermediarios del óxido nítrico y del oxígeno producido por los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. También se detectó una enzima de la familia de las peroxidoxin que inactivaría los radicales hidroxilo, producto de la acción de las enzimas SOD y GST, ya que el verme no tiene la catalasa.

Una serin-proteinasa inhibidora (Fh-KTM) que se produce en el intestino, parénquima y tegumento del verme adulto inhibe la actividad de la elastasa, producida por los eosinófilos, o interfiere en la actividad de las citocinas producidas por los linfocitos. Las captasinas y otras proteinasas que son secretadas durante el desarrollo del parásito pueden modular la respuesta inmune

al romper los CD-23 bajando la afinidad de los receptores para la IgE sobre la superficie de linfocitos B activados, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas foliculares, macrófagos y las plaquetas. También se ha demostrado que las catpsinas L y B rompen las inmunoglobulinas en la fracción Fab, lo que evita la respuesta de las células efectoras mediada por los anticuerpos⁵⁷. La catepsina B es reconocida principalmente en formas juveniles y participa en el exquistamiento y en la migración por los tejidos⁵⁸.

5. SÍNTOMAS CLÍNICOS

Los síntomas pueden ser muy variables y principalmente inespecíficos, lo cual dificulta una sospecha bien sea humana o veterinaria, y más aún en sitios donde la enfermedad no es endémica o no se conocen registros que puedan alertar de una posibilidad.

5.1 CASOS EN HUMANOS

Hasta la fecha son muy pocos los casos conocidos en Colombia de esta enfermedad en humanos, el primer caso, al parecer lo diagnosticó Federico Lleras Acosta en 1929, y a partir de ese caso aparecen cerca de 24 casos pero pocos confirmados realmente, cinco casos diagnosticados en 1952, en pacientes que habían consumido hígado de bovinos contaminados (posiblemente falsos positivos); un caso diagnosticado en 1955, en la región de Duitama, Boyacá, donde una paciente presentó un cuadro de larga evolución con dolor en hipocondrio derecho y presencia de huevos de *F. hepatica* en heces y en bilis; en 1973, se informó el primer caso de Fasciolosis humana en el Valle del Cauca; en 1981, se informaron 14 casos detectados por encuesta epidemiológica y tres casos en una misma familia en 1985. El último caso data de 1988, reportado por el hospital La María de Medellín. No se conocen más reportes hasta la fecha⁵⁹.

La sintomatología en los humanos se puede presentar en dos diferentes formas, aguda y crónica.

5.1.1 Forma aguda: puede presentarse en 3 formas principalmente típica, atípica y ectópica.

5.1.1.1 La aguda típica: cursa generalmente con fiebre prolongada, hepatomegalia y dolor abdominal- pueden encontrarse hemorragias en los conductos biliares intrahepáticos y algunas veces anemia. (ver tabla No. 1)

5.1.1.2 La aguda atípica: sus síntomas pueden ser respiratorios (tos, disnea, hemoptisis, derrame pleural, infiltrados parenquimales), cardiacos (pericarditis, insuficiencia cardiaca) y neurológicos (cefalea, síndrome meníngeo, síntomas focales, convulsiones y alteración de la función cognoscitiva).

5.1.1.3 La ectópica: se presenta debido a vermes inmaduros que se alojan en sitios diferentes al hígado, el lugar más frecuente es el tejido celular subcutáneo.

5.1.2 Forma crónica: suele tener dos fases, la sintomática y asintomática.

5.1.2.1 La sintomática, se presenta con cólico biliar, ictericia, colangitis y pancreatitis; en la mayoría de casos el diagnóstico se realiza intra-operatorio, hallándose los trematodos adultos obstruyendo las vías biliares, en otras ocasiones el diagnóstico se hace por imágenes o por otros métodos invasivos.

5.1.2.2 La asintomática, es quizás la forma más frecuente, en esta suelen estar los familiares del paciente sintomático, que pasan por desapercibido la fase aguda y evoluciona hasta la fase crónica después de muchos años de padecer las consecuencias secundarias que esto acarrea.

Tabla No 1. Características clínicas de la infección crónica por Fasciola hepática en niños

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de 61 pacientes con fasciolosis (forma crónica)

Manifestaciones clínicas	n (%)
Dolor abdominal	50 (82)
Epigástrico	23 (37.7)
Mesogástrico	19 (31.1)
Periumbilical	19 (31.1)
Hipocondrio derecho	12 (19.7)
Hipocondrio izquierdo	5 (8.2)
Difuso	3 (4.9)
Hipogástrico	1 (1.6)
Flanco izquierdo	1 (1.6)
Cefalea	36 (59)
Urticaria	33 (54.1)
Prurito anal	32 (52.5)
Mareos	30 (49.2)
Náuseas y vómitos	29 (47.5)
Dispepsia a grasas	26 (42.6)
Signo de Murphy	25 (41)
Astenia	23 (37.7)
Hiporexia	22 (36.1)
Diarrea	18 (29.5)
Historia de íctericia	17 (27.9)
Coluria	14 (23)
Escalofríos	9 (14.8)
Estreñimiento	5 (8.2)
Hepatomegalia*	2 (3.3)
Esplenomegalia	1 (1.6)

* La hepatomegalia fue determinada de acuerdo a la edad del paciente.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR FASCIOLA HEPÁTICA EN NIÑOS, Rev. Gastroenterol. Perú, Vol. 22 • Nº 3 • 2002, Marcos R, Maco Flores, Terashima I, Samalvides C, Gotuzzo H

Fuente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292002000300006

5.2 CASOS VETERINARIOS

A diferencia de la condición humana, es bien conocido que esta parasitosis en términos generales es principalmente un problema de salud veterinaria, pero en Colombia tampoco se cuenta con datos precisos y conocidos de prevalencias o estimaciones cercanas de la condición de esta enfermedad en animales, si bien existen algunos reportes que demuestran en algunas regiones del país una prevalencia hasta del 90% en bovinos, la cifra real esta aun por dilucidarse⁵⁹.

5.2.1 Los síntomas generales en los animales en la presentación aguda son: Fiebre ligera, abatimiento, debilidad, ictericia, aumento del volumen del hígado con dolor y ascitis. Estos síntomas de aparición rápida, son acompañados de muerte de animales.

5.2.2 Durante la sub-aguda, Las muertes se producen meses más tarde que en el caso de la Fasciolosis aguda. El examen clínico de los mamíferos permite observar la presencia de mucosas pálidas, lesiones sufridas en el parénquima y presencia de adultos en los conductos (post-mortem).

5.2.3 En la fase crónica, todo el rebaño puede presentar aletargamiento, vellones ralos (en casos de ovinos) y bajos índices de desarrollo corporal, (falta de peso, debilidad general, edema sub-mandibular y/o submaxilar acompañado de palidez de mucosas), así como disminución en la producción de leche y lana.

Como los signos clínicos de la Distomatosis son inespecíficos se necesita la confirmación del laboratorio o a través de una necropsia para arribar a un diagnóstico definitivo, en este caso las lesiones hepáticas y los vermes son muy evidentes.

6. DIAGNÓSTICO

Existen diversas formas de diagnosticar la Fasciolosis que se complementan y utilizan dependiendo de la fase de la infección pero también de acuerdo a las necesidades y recursos

6.1 DIAGNÓSTICO DIRECTO

El diagnóstico de la Fasciolosis se realiza al detectar los huevos en las heces del paciente. Las técnicas más utilizadas han sido las de concentración como la técnica de Ritchie, el Kato-Katz y las de sedimentación. De forma infrecuente se puede realizar el diagnóstico al encontrar vermes adultos en distintas localizaciones, siendo el más común en las vías biliares y se pueden observar en imágenes, o después de la intervención quirúrgica del árbol biliar o en el momento de la necropsia^{3, 60, 61}.

A pesar de la utilidad del diagnóstico directo y de su relación con la morbilidad, la coprología plantea varios problemas: Se requiere de la experticia del observador en la identificación de los huevos al microscopio o al estereoscopio. Dado que la puesta de huevos es discontinua se precisa analizar al menos tres muestras antes de dar la muestra como negativa. En los casos de Fasciolosis aguda en general asociada a la fase prepatente, no hay puesta de huevos por lo que el diagnóstico parasitológico directo no puede realizarse. En áreas con casos esporádicos y en áreas hipo-endémicas como el de nuestro país, el número de huevos por gramo de heces es bajo, aumentando las dificultades del diagnóstico directo. Todo esto ha conducido a un progresivo desarrollo de otros métodos de diagnóstico directo^{61, 62}.

La detección de antígenos circulantes se realiza mediante ELISA de captura o sándwich de *F. hepática*⁶². Éste consiste en la fijación de un anticuerpo

monoclonal frente a antígenos completos o purificados en una placa y posteriormente añadir la muestra problema. Se revela con una anti-inmunoglobulina policlonal unida a peroxidasa y se lee en lector de ELISA convencional. Sólo se han utilizado anticuerpos monoclonales frente a antígenos completos. La aparición en plasma de los antígenos circulantes se detecta en general precozmente, a partir de la 3ª semana post-infestación. Presenta una sensibilidad y especificidad próxima al 100%. Además el nivel de antígenos circulantes parece estar en relación directa con el grado de infestación⁶². Prácticamente está demostrado que el nivel de antígenos circulantes desciende a niveles de animales no infectados después del tratamiento con triclabendazol constituyendo un importante método para el control pos-tratamiento de las Fasciolosis⁶⁴.

En heces se han utilizado los mismos anticuerpos monoclonales detectándose coproantígenos en fases precoces de la infección. Una sola muestra de heces permite el diagnóstico de la infección en ésta fase en más del 80 % de los pacientes⁶⁵. También se están desarrollando las técnicas de PCR para el diagnóstico y diferenciación de las dos especies⁶⁶.

En los últimos años se ha avanzado en la optimización de una técnica de serodiagnóstico de Fasciolosis en ovejas por cromatografía líquida⁶⁷.

6.2 DIAGNÓSTICO INDIRECTO

Existen diversas técnicas que permiten la detección de anticuerpos frente a *F. hepática*. Entre estas, se encuentran las técnicas de precipitación; la inmunolectroforesis y contrainmunolectroforesis. En las técnicas de aglutinación como la hemoaglutinación indirecta, la sensibilidad diagnóstica en la Fasciolosis animal es superior al 85 % y la especificidad es del 85 %⁶⁸. Para humanos la sensibilidad puede oscilar entre 56 % y 100 % y una especificidad superior al 90 %

El mayor inconveniente es la dificultad en la interpretación del título lo cual conlleva en ocasiones problemas en los resultados⁶⁹.

La técnica ELISA permite la detección de anticuerpos dirigidos frente a distintos componentes antigénicos de *F. hepática*. Se han descrito diferentes antígenos eficaces para el diagnóstico. Se cuenta con el antígeno excretor-secretor procedente de vermes adultos del parásito. Cuando esta técnica utiliza el antígeno E/S Fh es superior a cuando se utiliza el antígeno crudo, con sensibilidad y especificidad superiores al 95 % tanto en modelos de infección experimental, como en casos de infección natural, constituyendo hoy el método de diagnóstico indirecto de elección⁶⁹. En la última década se han hecho pruebas utilizando el antígeno excretor-secretor de *F. gigantica* (E/S Fg) con valores de 98,2% y 100% de sensibilidad y especificidad respectivamente⁷⁰. Otro estudio compara los antígenos somáticos (*Fg So*) y las cisteinas-proteinasas de *F. gigantica* (*Fg CP*) para serodiagnóstico en humanos mediante ELISA. La sensibilidad fue de 100% para ambos antígenos y la especificidad fue calculada en 96,9% y 98,4% respectivamente⁷¹.

En los pacientes con un tratamiento eficaz, la detección de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) frente a *Fasciola sp.* puede permanecer positiva hasta 6-12 semanas con tendencia posterior a la desaparición⁶². Debido a los excelentes resultados del test de ELISA utilizando el Ag E/S Fh el desarrollo de otros antígenos purificados y recombinantes no se ha producido de forma importante. Entre los antígenos probados purificados para el diagnóstico está la cathepsin L1; cistein proteinasa secretada por los vermes juveniles y adultos con poder antigénico ^{62,69}. La sensibilidad de la técnica con este antígeno es algo inferior a la obtenida con el E/S Fh, aunque consigue discriminar mejor los casos positivos de los negativos. También se han probado péptidos sintéticos correspondientes a los 20 aminoácidos N-terminales de cathepsina L1; se han utilizado con fines diagnósticos en modelos de Fasciolosis bovina demostrando sensibilidades de

98,5 %; ligeramente inferior a la de E/S Fh y L-Cathepsina, pero mejor especificidad 99,8%, contra 82,8% y 94,6% respectivamente⁶¹. Utilizando la captosina L1 para diagnóstico humano mediante ELISA y comparándolo con el E/S Fh se obtuvo 100% de sensibilidad para ambos antígenos, 98,9% de especificidad para la captosina-L frente a 100% del E/S Fh ⁷¹. Otras moléculas como cistein proteasas de 27 kDa, Fas 1 y Fas 2, Glutación S-transferasa (GST), han demostrado menor potencial diagnóstico que la utilización de antígeno E/S Fh. Un estudio hecho en llamas con cistein-proteinasas Fas1 y Fas 2 mostró sensibilidades de 90 y 95% respectivamente ^{69, 72}.

La técnica de Western-Blot permite la detección de anticuerpos frente a determinantes antigénicos de *F. hepatica* previamente separados mediante una electroforesis. Distintos estudios han ratificado la importancia de éste método de confirmación de la técnica de ELISA⁶². No obstante, mientras algunos autores definen bandas de 17 y 63 kDa como específicas de *F. hepatica*, otros⁴⁶ indican proteínas en el intervalo de 25-27 kDa como características de la infestación. Es probable que estas diferencias radiquen en la forma de preparación de los antígenos de E/S Fh, ya que las bandas halladas en nuestro análisis no solo incluye las bandas mencionadas sino algunas otras importantes específicas de cada especie.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica ELISA en el laboratorio central de investigación de la Universidad Industrial de Santander para el diagnóstico de Fasciolosis en bovinos, ovinos y humanos.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obtener en el laboratorio el Antígeno de Excreción Secreción de *Fasciola hepática*
- ❖ Establecer las condiciones óptimas que la técnica debe cumplir para poder realizarse de manera rutinaria.
- ❖ Comparar los resultados de la técnica, entre el Antígeno E/S total (crudo) de *Fasciola hepática*, con dos fracciones purificadas/filtradas del mismo.
- ❖ Aplicar esta herramienta diagnóstica en una población de la provincia de García Rovira en el departamento de Santander, Colombia.
- ❖ Realizar Western Blot con el Antígeno E/S total de *Fasciola hepática* para conocer la fracciones proteicas más antigénicas del preparado.

8. METODOLOGÍA

La técnica ELISA se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes (reacción antígeno – anticuerpo en el caso de este trabajo específica de Fasciolosis) tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar el anti anticuerpo marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción “antígeno-anticuerpo” quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico sobre el cual actuará la enzima produciendo un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un lector de ELISA.

Esta técnica, es ampliamente utilizada con relación a otras técnicas de diagnóstico dada su simplicidad, sensibilidad, especificidad, confianza y bajo costo de implementación; algunas de estas ventajas, como la sensibilidad y especificidad, dependen de las características y de la concentración del antígeno adsorbido en los pocillos de poliestireno, el cual está estrechamente relacionado con la calidad del preparado antigénico que se utilice, La concentración y calidad adecuada del antígeno, por otra parte, son factores cruciales que determinarán en definitiva la sensibilidad del ensayo⁷³. Por este motivo, en este estudio se utiliza el método de Bradford⁷⁴ como procedimiento para la determinación de la concentración de proteínas dado que se caracteriza por su fácil y sencilla ejecución, igualmente, presenta una mayor sensibilidad y estabilidad frente a cationes (sodio, potasio), carbohidratos, en comparación con otros métodos colorimétricos como el test de Lowry y el test de Biuret⁷⁴ y que ha sido ensayado con éxito por otros investigadores.

Dado el propósito del estudio, se decidió la preparación del antígeno de E/S Fh ya que en un ELISA indirecto, la solución sencilla del extracto antigénico permite la

posibilidad de identificar la infestación de forma rápida capturando los anticuerpos de tipo IgG.

Las experiencias realizadas por otros investigadores indican que el extracto proteico del Ag de E/S, presenta una mayor sensibilidad que una preparación de antígeno crudo proveniente de un parásito adulto⁷³. Por otra parte, se describe que tanto los antígenos somáticos y de E/S, comparten algunos de sus determinantes antigénicos^{75, 76, 77}, la cantidad relativa de epitopes es más variable en los antígenos de E/S, que en un antígeno somático, haciendo más estable la respuesta inmune frente a los antígenos E/S^{73, 77, 81}.

8.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ELISA INDIRECTA PARA BOVINO, OVINOS Y HUMANOS

8.1.1 Preparación de reactivos. Se preparó el medio RPMI, y los demás reactivos a utilizar:

- Solución salina estéril 0.9% con antibióticos (penicilina-estreptomicina al 1%)
- Ácido clorhídrico al 37% (HCl)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Bicarbonato al 7.5%
- Medio RPMI, 1L estéril, [filtrado con membrana de 0.22 micras, y adicionado con antibióticos, (penicilina-estreptomicina al 1%), alicuotado en cajas de 20 mL]

Ver anexo E. (Protocolo de preparación de medios y reactivos)

8.1.2 Obtención del Ag E/S Fh. Se obtuvo el Antígeno Excretor Secretor total de *Fasciola hepatica*, con vermes adultos y fue necesario liofilizar el Antígeno producido para su conservación y posterior comparación.

Ver anexo F. (Protocolo de obtención de Ag E/S total de F. hepatica)

8.1.3 Medición de la concentración de proteínas del Ag E/S total mediante el método de Bradford

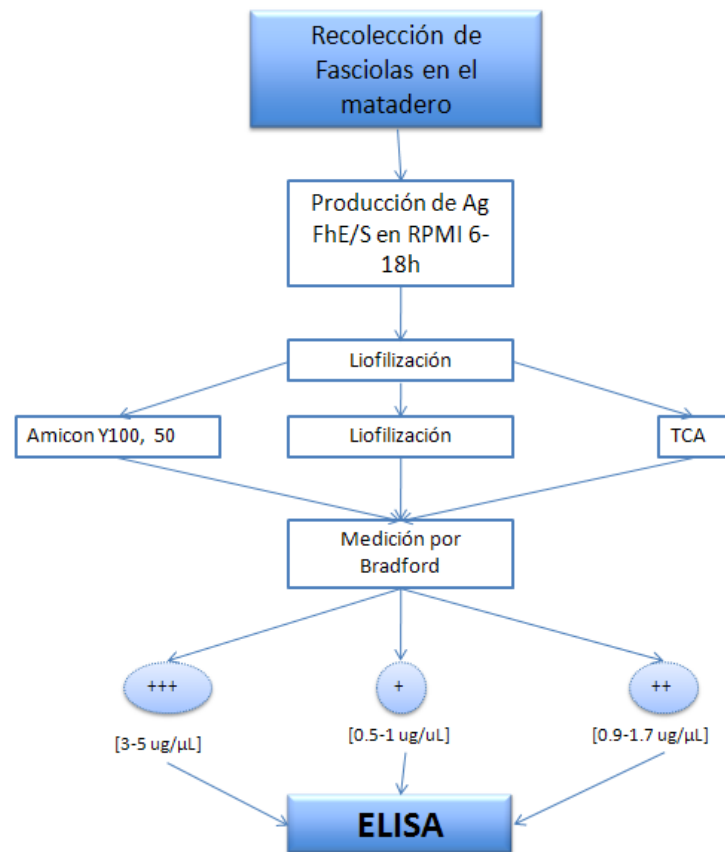
Ver anexo G. (Protocolo de Bradford, medición de concentración de proteínas)

8.1.4 Se filtró el producto del mantenimiento de los vermes en el laboratorio a través de dos membranas de columna para obtener preparados con características diferentes en cuanto al tamaño de las proteínas que lo conforman, el primer filtro de 100 KDa, y el segundo de 50KDa.

8.1.5 Parte del preparado antigénico se concentró y purificó por el método de ácido tricloro-acético (TCA). (Ver anexo H, Protocolo de precipitación de proteínas TCA).

8.1.6 Medición de la concentración de proteínas. Se midió la concentración del Ag E/S total y de los dos preparados por Amicon, así como del procesado por TCA, mediante el método de Bradford. (Figura No. 2)

Figura No 2. Esquema general pre- ELISA.



8.2 ESQUEMA GENERAL REALIZADO

En la estandarización de la técnica de ELISA se tomaron dos grupos cada especie de animales y dos grupos de humanos con sus respectivos sueros:

- Cuarenta sueros negativos de humanos para *F. hepática* (de región libre de Fasciolosis) para establecer los controles negativos.
- Seis sueros positivos de humanos para *F. hepática* (centro de investigaciones de medicina tropical de la Universidad Central de Venezuela, UCV) para establecer los controles positivos.

- Cuarenta sueros negativos de bovinos para *F. hepática* (de región libre de Fasciolosis, confirmados por serología en la UCV mas examen por coprolgía negativo) para establecer los controles negativos.
- Cuarenta sueros positivos de bovinos para *F. hepática* (colectados de región endémica, analizados y confirmados por serología en la UCV mas examen por coprolgía positivo) para establecer los controles positivos.
- Cuarenta sueros negativos de ovinos para *F. hepática* (de región libre de Fasciolosis, confirmados por serología en la UCV mas examen por coprolgía negativo) para establecer los controles negativos.
- Cuarenta sueros positivos de ovinos para *F. hepática* (colectados de región endémica y analizados y confirmados por serología en la UCV mas examen por coprolgía positivo) para establecer los controles positivos.
- Quince sueros positivos a otros Nematodos y Cestodos en bovinos y ovinos (para establecer el nivel de reacción cruzada).
- Quince sueros positivos a otros Nematodos y Cestodos en humanos (para establecer el nivel de reacción cruzada)

El número de sueros analizados tanto de animales como de humanos se hizo a conveniencia, debido a la dificultad de su consecución, intentando contar con la mayor cantidad posible.

El punto de corte para cada especie se obtuvo por dos metodologías diferentes: por medio de la curva ROC, utilizando el programa estadístico STATA 11, y el otro método fue estadística básica (el promedio de la lectura de la densidad óptica de los sueros negativos y sumando 3 desviaciones estándar).

- Se obtuvo la sensibilidad de la prueba al comparar la lectura de la densidad óptica (DO) de los resultados positivos, frente a los verdaderos positivos (confirmación por ELISA en la UCV) siendo analizados los resultados corridos tanto de animales como de humanos.

- Se obtuvo la especificidad de la prueba al comparar la lectura de la DO de los resultados negativos, frente a los verdaderos negativos (confirmación por ELISA en la UCV) siendo analizados los resultados corridos tanto de animales como de humanos.

ELISA Indirecto, consta de las siguientes etapas:

- Fijar del antígeno específico al soporte para la captura de los anticuerpos objeto de estudio. (con ensayos de diferentes concentraciones del antígeno seleccionado para ver cual permite la mejor adherencia).
- Lavar la placa para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Bloquear con diferentes sustancias como leche de soja, leche descremada, gelatina sin sabor, albumina etc. En diferentes concentraciones como al 1, 5 y 10% para cada especie.
- Adicionar el suero problema (esta dilución debe ser probada 1:100, 1:200 y 1:500, para cada especie).
- Lavar para eliminar los anticuerpos que no hayan interactuado y no estén fijados.
- Adicionar el anti-anticuerpo conjugado con peroxidasa.
- Lavar para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no estén fijados.
- Adicionar el substrato (también probando diluciones de 1:3.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 y 1:50.000 para cada especie).
- Bloquear la reacción con ácido sulfúrico 2N.
- Leer por espectrofotometría el producto final coloreado, cada muestra se monta por duplicado en la misma placa y se lee al mismo tiempo, por una sola persona para eliminar posibles deficiencias en la manipulación e intentar controlar el factor humano lo mejor posible.

Ver anexo I. (Protocolo de estandarización de la técnica ELISA para Fasciolosis humana).

Ver anexo J. (Protocolo de estandarización del ELISA para Fasciolosis bovina y ovina).

La técnica ELISA se realizó tanto con el antígeno total E/S (crudo) de *F. hepática* como con las fracciones filtradas, para comparar y analizar resultados de sensibilidad y especificidad de cada uno.

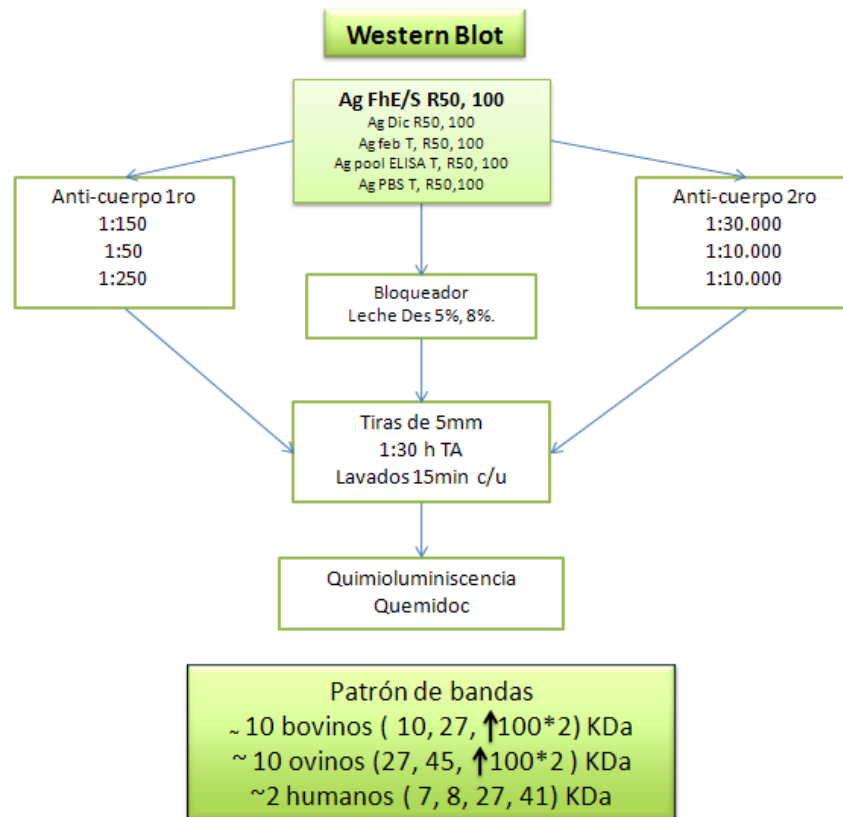
Western Blot

Una vez estandarizada la técnica de ELISA, se dio paso a la verificación, mediante un Western Blot, de la antigenicidad de las diferentes proteínas separadas del Ag E/S Fh total y de los filtrados.

- Se estandarizó la concentración de proteínas a la que se debe correr la electroforesis para que haya una óptima separación y diferenciación entre ellas.
- La transferencia de las proteínas se realizó en membrana de nitrocelulosa durante toda la noche a 20 Voltios.
- Se transfirieron las fracciones separadas a la membrana (papel de nitrocelulosa) para ser fijadas.
- La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada exactamente igual que para el ELISA, con leche descremada al 5%, durante 1h y 30 minutos y a temperatura ambiente.
- Los lavados de las tiras cortadas de nitrocelulosa se realizaron por triplicado, 15 minutos cada uno, y fueron cortadas de a 5 mm para poderse conservar en nevera hasta su uso.

- Se expusieron las tiras cortadas de la membrana de nitrocelulosa con los sueros controles positivos, para visualizar la interacción específica antígeno-anticuerpo (Figura No. 3)
- La incubación de las tiras con el anticuerpo primario se realizó durante 1h y 30 min, a Temperatura ambiente y las diluciones del suero fueron: para humanos 1:150, para bovinos 1:250 y para ovinos 1:50; la incubación con el anticuerpo secundario fue igual que el anterior solo cambiando las diluciones, para humanos 1:30.000, para bovinos y ovinos 1:10.000
- La lectura de las tiras se realizó en el equipo QUEMIDOC con adición del reactivo quimio-luminiscente e inmediata lectura.

Figura No 3. Procedimiento general para la técnica de Western Blot.



8.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se compararon los resultados de los diferentes preparados antigénicos, definiendo cual era el óptimo para el trabajo y la confirmación del diagnóstico de la parasitosis en casa especie animal y en el humano y así contar con los datos respectivos para presentación en publicaciones dejando claro cada paso del proceso y como debe realizarse para tener reproducibilidad.

8.4 APLICACIÓN DE LA PRUEBA

Se aplicó la prueba a una población muestreada de bovinos, ovinos y humanos de la provincia de García Rovira del departamento de Santander, Colombia. (Municipio de San Andrés)

8.5 NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS

Los animales que fueron seropositivos se notificaron a su respectivo dueño y ante las autoridades pertinentes para dar a conocer la situación de la parasitosis en la región. De igual forma a los humanos se les reporto personalmente su resultado.

9. ASPECTOS ÉTICOS

Acta tomada del Comité de ética para la Investigación Científica (CEINCI) de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

“De acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki con respecto al diseño científico y experiencias previas en animales, donde se pondera el principio de la proporcionalidad entre riesgos predecibles y beneficios posibles, el respeto a los derechos del sujeto, prevaleciendo su interés por sobre los de la ciencia y la sociedad, el consentimiento Informado y respeto por la libertad del individuo; en el Reporte Belmont, en el cual se consigna el respeto por las Personas, Beneficencia, y Justicia; y en la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 por la cual el ministerio de salud de la República de Colombia establece las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y en cumplimiento con los aspectos mencionados con el artículo 6 de la presente Resolución, este estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- Ajustar y explicar brevemente los principios éticos que justifican la investigación de acuerdo a una normatividad a nivel internacional y a nivel nacional la Resolución 008430/93.
- Fundamentar si la experimentación se realizó previamente en animales, en laboratorios o en otros hechos científicos.
- Explicar si el conocimiento que se pretende producir no puede obtenerse por otro medio idóneo (fórmulas matemáticas, investigación en animales)
- Expresar claramente los riesgos y las garantías de seguridad que se brindan a los participantes.
- Contar con el Consentimiento Informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la Resolución 008430/93

- Relacionar la experiencia de los investigadores y la responsabilidad de la entidad académica.
- Establecer que la investigación se llevará a cabo cuando se obtenga la autorización: del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se realice la investigación; el consentimiento Informado de los participantes; y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución⁷⁸.

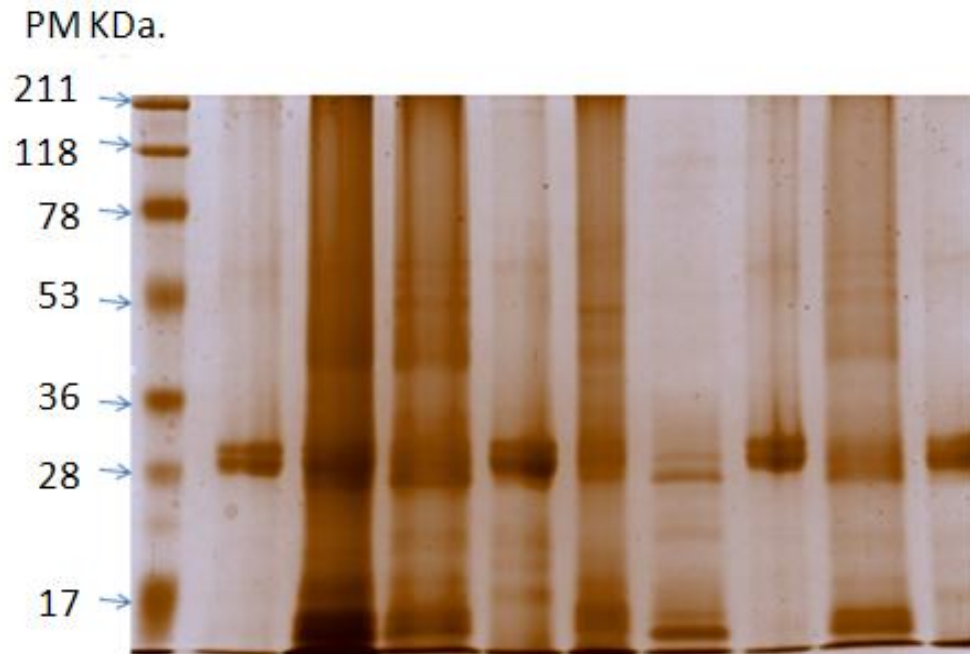
Formatos que se deben utilizar para llevar a cabo la investigación:

- Consentimiento informado para toma de muestras de animales (Anexo A)
- Consentimiento informado para toma de muestras de humanos (Anexo B)
- Protocolos para la toma de muestras de animales y de humanos. (Anexo C)
- Formato reporte de resultados coprológicos y serológicos de humanos (Anexo D)

10. RESULTADOS OBTENIDOS

- Se estandarizó una técnica serológica, con alto grado de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de Fasciolosis en bovinos, ovinos y humanos, útil para profundizar en la caracterización epidemiológica de la enfermedad en el departamento de Santander y otras regiones del país.
- El Ag E/S Fh, que se utilizó en la estandarización fue el producido y recolectado durante los intervalos de 6 - 18 horas de incubación, con los cuales se realizó un pool para facilitar el manejo en el laboratorio del antígeno. La incubación de los vermes se realizó de manera individual en incubadora de CO₂ al 5%.
- Todos los preparados obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en las mismas condiciones, dando como resultado diferentes patrones de bandas según su procedimiento esto con el fin de identificar cuál de ellos era el más idóneo para seleccionarlo y utilizarlo en la prueba diagnóstica de la población (Figura No. 4)
- Se encontró que la concentración del antígeno liofilizado total, tiene una concentración de 1 µg/µL, el procesado por el método de TCA es de 2.2 µg/µL, mientras que los preparados con los filtros Amicon tanto de poro de 100 como de 50 KDa, arrojan concentraciones por encima de los 4.1 µg/µL de proteína.

Figura No 4. Productos del Ag E/S Fh sometidos a diferentes procesos una vez recolectados de la incubación, corridos en electroforesis con gel de poliacrilamida al 12%. (*PM: peso molecular en KDa)



- La concentración de antígeno seleccionado para tapizar las placas, fue de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
- Los lavados de las placas se realizaron con PBS tween 20 al 0,05%, durante dos minutos cada uno.
- El bloqueador de las placas seleccionado como óptimo para las tres especies involucradas fue la leche descremada al 5%. (Figura No. 5)
- El tiempo de incubación fue de 1h a 37 ° C.
- Los sueros se incubaron en diluciones de 1:200 para humanos y ovinos y de 1:500 para bovinos.
- La incubación con el anti anticuerpo (anti-IgG) específico de especie se estandarizó de la siguientes forma 1:50.000 para humanos y 1:20.000 para animales (Figura No. 6)

Figura No 5. Cuadro comparativo entre diferentes bloqueadores usados para ELISA, discriminación de controles positivos y negativos.

Bloqueadores	Ovinos	Bovinos	Humanos
Leche Soja 1%	x	x	x
Leche soja 5%	x	x	√
Leche Des 1%	x	x	x
Leche Des 5%	√	√	√
Gelatina 0.2%	x	x	x
Gelatina 0.5%	x	x	x

Figura No 6. A). Cuadro comparativo para las diluciones del anti IgG, discriminación de controles positivos y negativos. B). diluciones probadas para el substrato revelador de la reacción.

A

Anti IgG	Ovinos	Bovinos	Humanos
1:10.000	++	++	-
1:20.000	+++	+++	-
1:30.000	++	++	+
1:40.000	-	-	++
1:50.000	+	+	+++

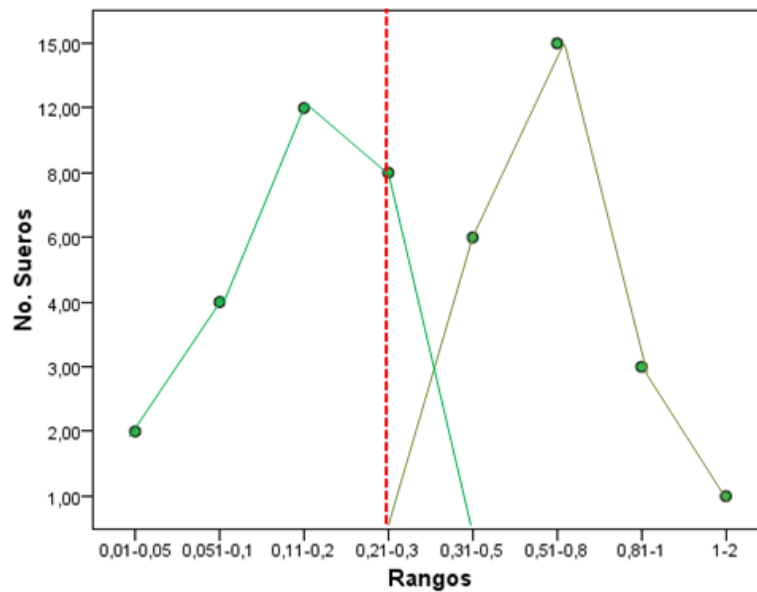
B

Sustrato: OPD	Diferenciación Pos/Neg
2 mg/placa	-
4 mg/placa	-
6 mg/placa	-
8 mg/placa	-
10 mg/placa	+
20 mg/placa	-

Convenciones:

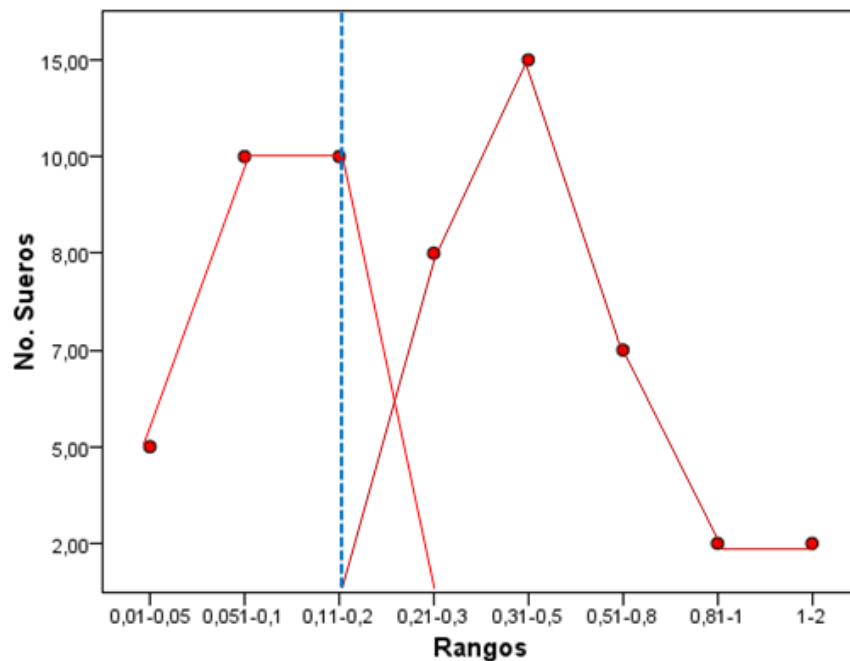
- No hay discriminación de los controles positivos y negativos.
+ Poca discriminación de los controles positivos y negativos.
++ Moderada discriminación de los controles positivos y negativos.
+++ Alta discriminación de los controles positivos y negativos.
- La adición del substrato (OPD), fue a una concentración de 10mg/placa, a una temperatura promedio de 20°C, durante 8 minutos, independientemente de la especie con la que se realizó el montaje.
- Se realizó el bloqueo de la reacción con ácido sulfuro 2N (50 µL/pozo).
- La lectura de la absorbancia de cada muestra fue hecha en un lector de ELISA (iMark Biorad) a 490 nm por duplicado.

Figura No 7. Absorbancias de los sueros de bovinos



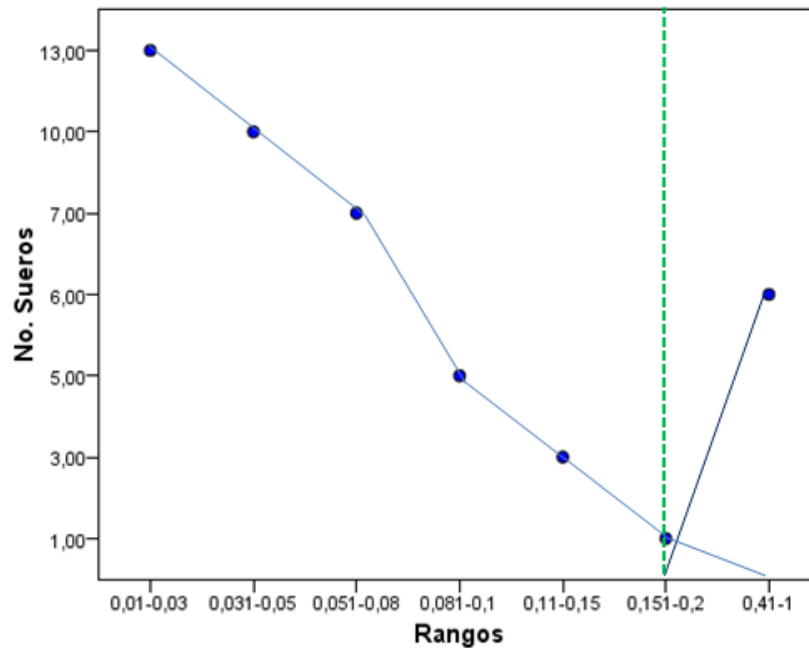
Se enfrentaron los sueros analizados contra los rangos en DO leídos por el equipo. En la gráfica No. 7 se observa a la izquierda la curva de sueros negativos y a la derecha la curva de sueros positivos, la línea transversal hace una aproximación del rango donde debería estar el punto de corte para los bovinos, evitando los falsos negativos.

Figura No 8. Absorbancias de los sueros de ovinos



De la misma forma se enfrentaron los sueros analizados contra los rangos en DO leídos por el equipo. En la gráfica No. 8 se observa a la izquierda la curva de sueros negativos y a la derecha la curva de sueros positivos, la línea transversal hace una aproximación del rango donde debería estar el punto de corte para los bovinos, evitando los falsos negativos.

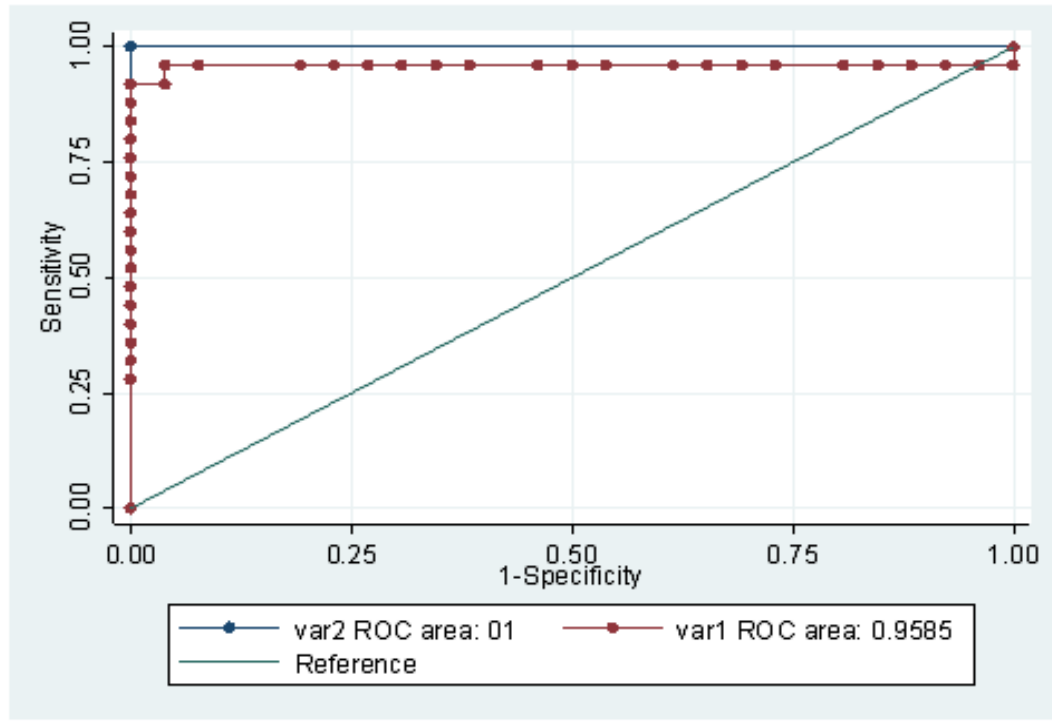
Figura No 9. Absorbancias de los sueros de humanos



Y finalmente se enfrentaron los sueros analizados contra los rangos en DO leídos por el equipo. En la gráfica No. 9 se observa a la izquierda la curva de sueros negativos y a la derecha la curva de sueros positivos, la línea transversal hace una aproximación del rango donde debería estar el punto de corte para los bovinos, evitando los falsos negativos.

Una vez realizado el análisis por medio de la curva ROC en el paquete estadístico SPSS, los puntos de corte calculados en el ELISA fueron: para bovinos, 0.284; para ovinos, 0.183 y para humanos, 0.150. la sensibilidad y especificidad fue del 96% y 96.1%, 100% y 85.1%, y 100% y 96.9% respectivamente. (Figuras No. 10, 11 y 12)

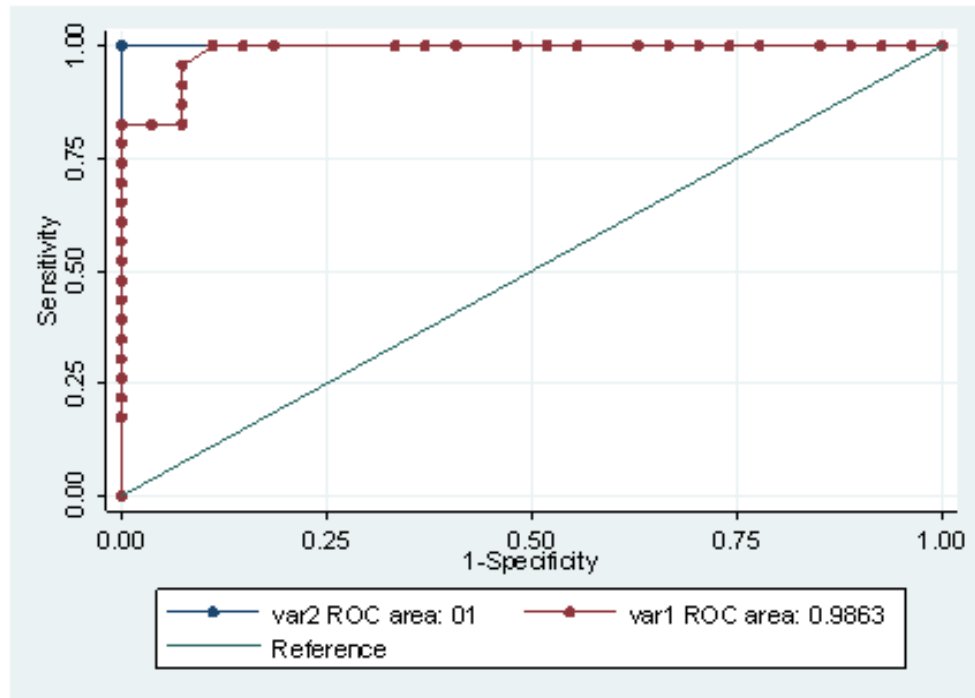
Figura No. 10. Curva ROC (sueros de bovinos).



Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
(>= .284)	96.00%	96.15%	96.08%	24.9600	0.0416

En la Figura No 10 se observa el punto de corte (0.284) con su respectiva sensibilidad (96%) y especificidad (96.1%) para los sueros de los bovinos.

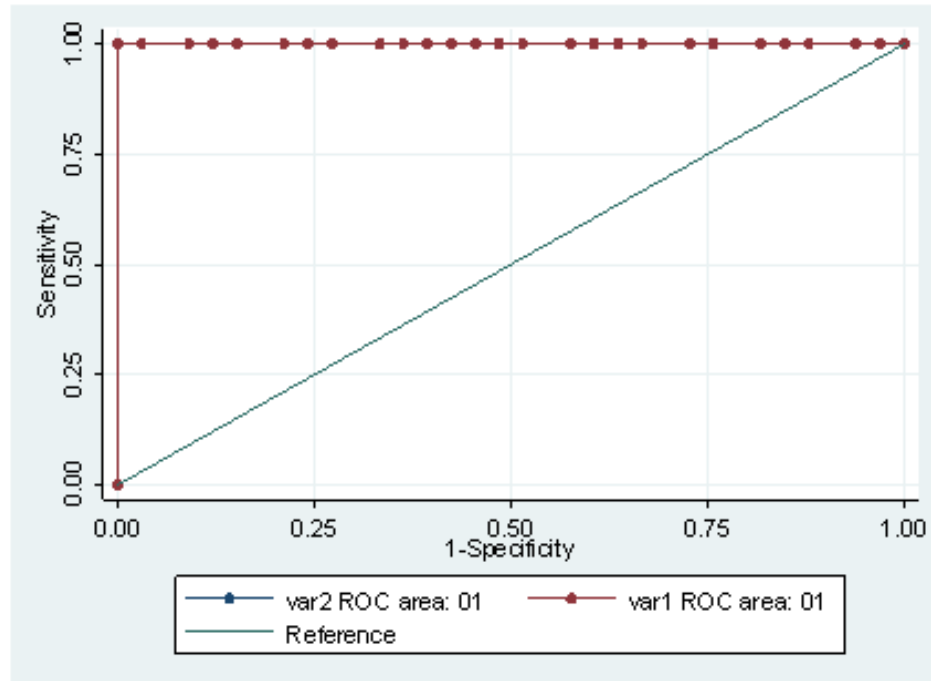
Figura No. 11. Curva ROC (sueros de ovinos).



Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
(\geq .183)	100.00%	85.19%	92.00%	6.7500	0.0000

En la Figura No 11 se observa el punto de corte (0.183) con su respectiva sensibilidad (100%) y especificidad (85.19%) para los sueros de los ovinos.

Figura No. 12. Curva ROC (sueros de humanos).

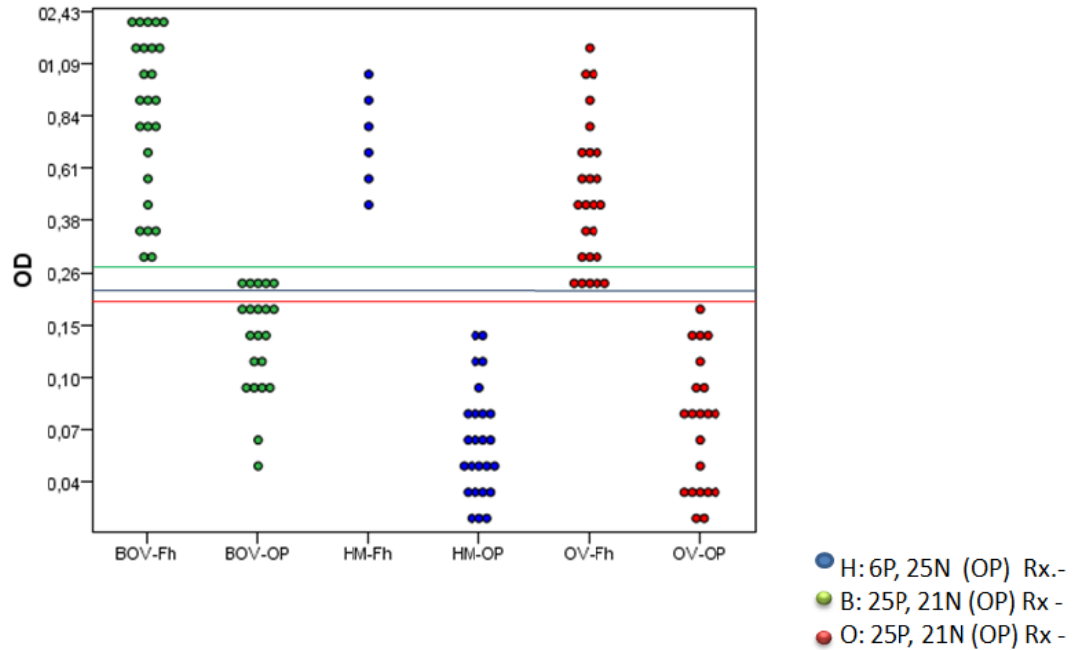


Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
($\geq .15$)	100.00%	96.97%	97.44%	33.0000	0.0000

En la Figura No 12 se observa el punto de corte (0.150) con su respectiva sensibilidad (100%) y especificidad (96.9%) para los sueros de humanos.

Las curvas ROC se realizaron en el programa estadístico SPSS, que determina el punto de corte con la respectiva sensibilidad y especificidad para cada grupo analizado.

Figura No 13. Reacción cruzada para las tres especies con antígeno E/S Fh (programa estadístico SPSS).



*Humanos OP: *Tenia spp.*, As, SS, Unc, TT, LV, LC, Chag, Abs hep, VIH, Toxoc, Toxop, *I. belli*.

*B ovinos OP: Trichos, Cooperi, Eimeria, Oesoph, Toxocara, Haemon, Moniezi, Ostertag, *Paramphistomum sp.*, Nemato, Bonosto.

*Ovinos OP: Cooperia *Paramphistomum sp.*, Haemon, Trichostr, Nemato, Bonosto, Eimeria, Moniezia

Convenciones:

BOV-Fh: sueros de bovinos positivos a *F. hepática*.

HM-Fh: sueros de humanos positivos a *F. hepática*.

HM-OP: suero de humanos positivos a otras parasitosis.

OV-Fh: sueros de ovinos positivos a *F. hepática*.

OV-OP: suero de ovinos positivos a otras parasitosis.

El análisis de las reacciones cruzadas para cada especie fue negativo con todos los agentes probados simultáneamente (Figura No. 13).

De otra forma como alternativa académica se determinó la sensibilidad (S) y especificidad (E) de cada especie analizada por el método clásico (Tablas No. 2, 3 y 4), para observar la variabilidad de los resultados, arrojando que sus diferencias no eran relevantes para el estudio.

Tabla No 2. Determinación de Sensibilidad y Especificidad en los bovinos. S del 100% (24/24) y E del 96.2% (26/27).

Bovinos	Serología UCV (Venezuela) positiva	Serología UCV (Venezuela) negativa	Total
Serología estandarizada positiva	24	1	25
Serología estandarizada negativa	0	26	26
	24	27	51

Tabla No 3. Determinación de Sensibilidad y Especificidad en los ovinos. S del 100% (25/25) y E del 92% (23/25).

Ovinos	Serología UCV (Venezuela) positiva	Serología UCV (Venezuela) negativa	Total
Serología estandarizada positiva	25	2	27
Serología estandarizada negativa	0	23	23
	25	25	50

Tabla No 4. Determinación de Sensibilidad y Especificidad en los humanos. S del 100% (6/6) y especificidad del 100% (33/33).

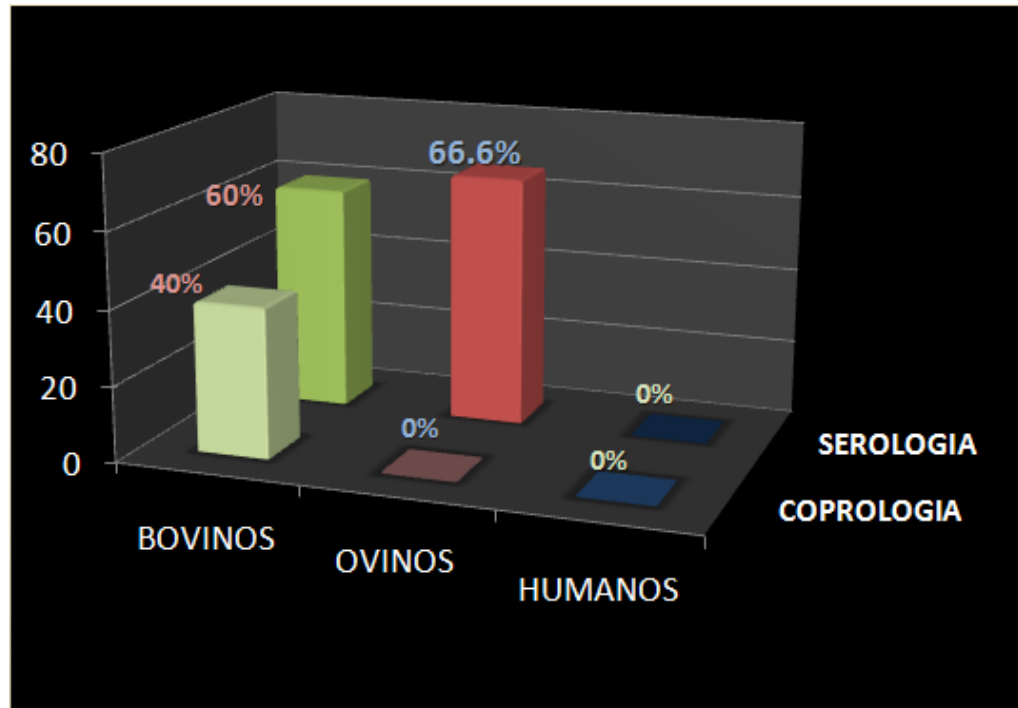
Humanos	Serología UCV (Venezuela) positiva	Serología UCV (Venezuela) negativa	Total
Serología estandarizada positiva	6	0	6
Serología estandarizada negativa	0	33	33
	6	33	39

- Los resultados obtenidos de la aplicación del ELISA para Fasciolosis a una población del municipio de San Andrés de la provincia García Rovira del departamento de Santander fueron los siguientes: 0% de positividad en humanos, 60% en bovinos y 83,3% en ovinos (Tabla No. 5 y Figura No. 14)

Tabla No 5. Tabla resumen de la positividad encontrada en el municipio de San Andrés, Santander - Colombia

	Serología post.	Serología neg.	total	% Post	S%	E%
Bovinos	24	16	40	60	96	96.1
Ovinos	10	5	15	66.6	100	85.1
Humanos	0	25	25	0	100	96.9

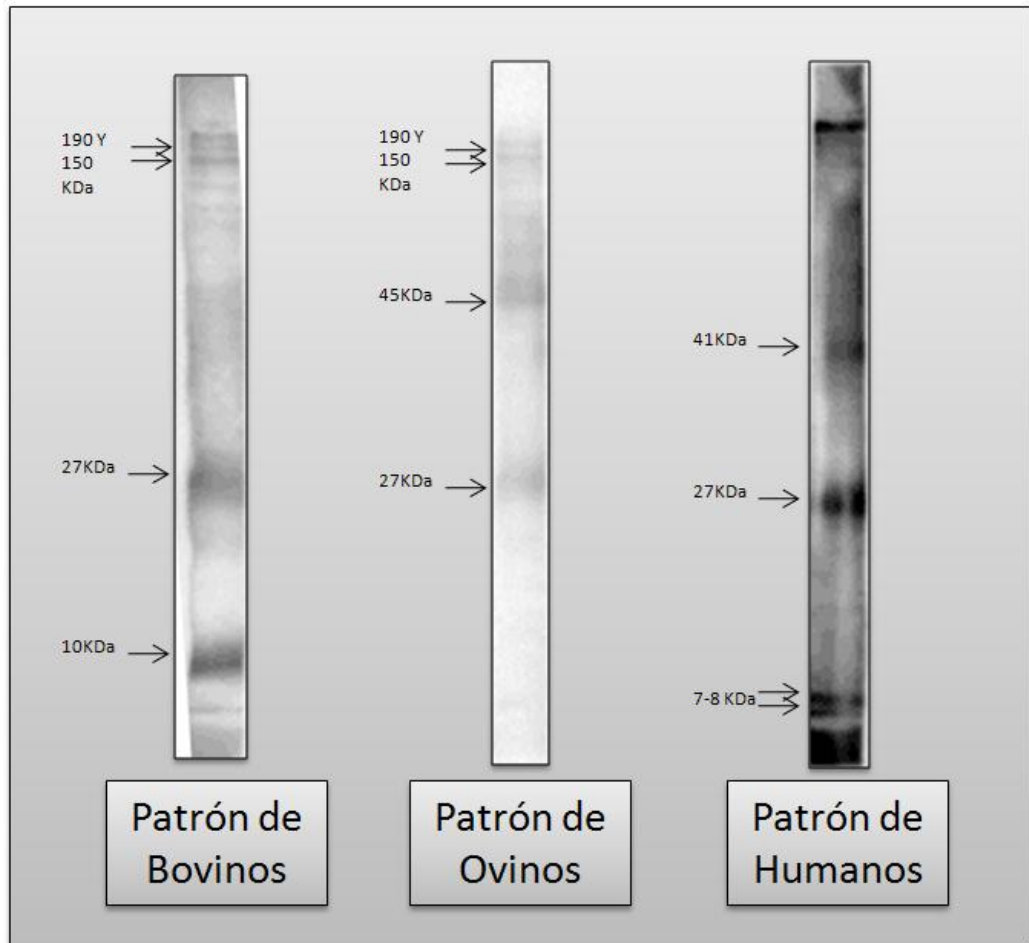
Figura No. 14. Consolidado comparativo de serología con coprología de la aplicación del ELISA para Fasciolosis a una población del municipio de San Andrés de la provincia García Rovira del departamento de Santander.



10.1 RESULTADOS DEL WESTERN BLOT

La concentración utilizada del antígeno para la electroforesis fue de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en gel de poliacrilamida al 12% y el antígeno seleccionado para esta fase del diagnóstico fue el filtrado por membrana Amicon de 50 KDa. (Figura No. 15)

Figura No 15. Patrón de bandas del Western Blot específica de cada especie para confirmar e identificar un caso de Fasciolosis.



Patrón de bandas
~ 10 bovinos (10, 27, 150 Y 190) KDa
~ 10 ovinos (27, 45, 150 Y 190) KDa
~ 3 humanos (7, 8, 27, 41) KDa

10.2 RESULTADOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA

- Se ayudó a complementar un trabajo de actualización en el diagnóstico, la contextualización y en la metodología del abordaje de la Fasciolosis en nuestra región.
- Se aportó al conocimiento científico de la enfermedad para acercarse a la realidad de la situación a nivel nacional ya que se aplicó la prueba a la población total muestreada de bovinos, ovinos y humanos de la provincia de García Rovira, Santander, Colombia. (muestra recolectada en el marco del proyecto numero110252128902 aprobado por Colciencias)
- Se cuenta con una herramienta diagnostica útil para promover la política de extensión de la Universidad Industrial de Santander contribuyendo a los intereses sociales, económicos y en salud de la comunidad en general.

11. DISCUSIÓN

La Fasciolosis es un problema de importancia en salud humana y veterinaria, con estimación de 600 millones de animales infestados en el mundo y casos humanos reportados en los 5 continentes. La OMS estimó en 2,4 millones las personas que están infestadas por *F. hepática* y hasta 180 millones las que están en riesgo de infestarse en el futuro^{3, 5}, otras fuentes afirman que la cifra de personas en esta condición puede llegar a los 17 millones y paulatinamente se está reportando un aumento gradual en la presentación de la enfermedad; tanto en el número de los países como en el número total de pacientes infestados⁵.

Esta enfermedad se comporta de manera crónica en el ser humano y no se hace evidente hasta alcanzar daños en algunas ocasiones irreversibles, alterando de manera drástica la calidad de vida del individuo infestado; cuando se presenta en infantes puede afectar el desarrollo integral adecuado, generando así un deterioro progresivo de su condición.

En la actualidad existen diferentes técnicas con las cuales se puede hacer un diagnóstico serológico de Fasciolosis animal o humana, entre ellos se encuentra inmunodifusión en gel, Western Blot, ELISA directo e indirecto; como ramificaciones de este último, se encuentran varias metodologías que divergen en los antígenos utilizados para el reconocimiento por parte de los anticuerpos, están las proteínas de antígenos somáticos/tegumento, antígenos de excreción secreción (E/S), fracciones purificadas del Ag E/S y proteínas recombinantes.

La importancia del diagnóstico está en buena parte representada en la inexistencia de las condiciones sociales y económicas para enfrentar la problemática desde la prevención únicamente, haciendo de esta enfermedad un problema que fácilmente puede salirse de control y ocasionar situaciones y dificultades que condicionan la vida de mucha población y sus respectivos animales.

El antígeno E/S Fh producido en el laboratorio para la estandarización del ELISA tiene una alta calidad, (teniendo similitud en sus resultados con el producido en el laboratorio de inmunología de la UCV y con el del laboratorio de parasitología molecular de la Universidad de Puerto Rico)^{27, 28, 82} demostrando que el proceso establecido fue adecuado y posee una gran capacidad discriminadora entre pacientes positivos y negativos; al igual que el antígeno seleccionado para la prueba confirmatoria (Western Blot), que resultó tener una especificidad muy buena, donde se encontró patrones de bandas definidas para cada especie, que pueden confirmar con certeza la condición del paciente frente a la parasitosis estudiada.

Al obtener en el laboratorio el antígeno de excreción secreción de *Fasciola hepática*, encontramos concentraciones bastante favorables, que pudieron ser eficientes a la hora de tapizar las placas del ensayo. Con los filtro de Amicon los valores oscilaron desde 4 hasta 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, con el método de TCA fueron entre 3 – 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y con la liofilización únicamente la concentración máxima fue de 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Cualquier concentración de las obtenidas fue útil para la sensibilización de las placas y dieron muy buenos resultados a la hora de discriminar los sueros controles positivos y negativos, sin embargo se decidió utilizar de preferencia el filtrado por Amicon, debido a que de igual forma se escogió para la prueba de Western blot ya que fue el que mejor discriminación de bandas arrojó.

En el momento de comparar los resultados de la técnica ELISA, entre el antígeno E/S total (crudo) de *F. hepática*, con las dos fracciones purificadas/filtradas del mismo (Y100, Y50), no se obtuvo diferencias significativas encontrando que cualquier antígeno utilizado para esta técnica puede ajustarse y ser muy conveniente; contrario a lo que mostro el Western blot, mientras que las fracciones filtradas por Amicon dieron resultados muy limpios y claros, no sucedió lo mismo con el liofilizado únicamente, ya que este último conserva aún muchas impurezas y restos de los componentes no proteicos del antígeno preparado inicialmente. En

caso de no poder contar con el Amicon puede utilizarse el preparado con TCA que si bien no fue el mejor resultado en comparación, se puede obtener de manera sencilla haciéndolo costo efectivo para cualquier laboratorio.

El protocolo estandarizado en nuestro laboratorio para la técnica de ELISA, tiene algunas diferencias y semejanzas con los realizados en otros lugares, fundamentalmente difiere en las condiciones como se mantiene los vermes en el momento de la incubación^{27, 28}, condición que puede haber marcado la diferencia que se encontró en la concentración del antígeno seleccionado, así como la cantidad usada para tapizar las placas e incluso pudiendo afectar la capacidad discriminativa frente a las posibles reacciones cruzadas que se estudiaron⁶⁹, ya que los tiempo de incubación durante 36 horas, y la temperatura a 37⁰ C, son condiciones idóneas y favorables para los vermes, dando la oportunidad para que hagan el proceso de adaptación al nuevo ambiente y logrando una calidad del producido adecuada, además la incubación individual de los vermes permite seleccionar los que sobreviven y los que no, desechando todo el medio de los que mueren en el proceso, evitando así la contaminación con proteínas de apoptosis que pueden estar involucradas en los procesos de reacción cruzada.

En cuanto al cálculo del punto del corte, se realizó por dos alternativas dejando finalmente la hallada mediante la curva ROC ya que las diferencias no fueron significativas dentro de los tres análisis respectivos (animales y humanos), la diferencia más alta se encontró en los bovinos, el punto de corte seleccionado por la curva ROC fue de 0.285, mientras que el análisis por el promedio de los negativos más tres desviaciones estándar dio 0.276, concluyendo que la mejor forma de presentar los datos hallados era mediante la curva ROC, debido a la rigurosidad del análisis, con los datos suministrados al programa estadístico.

El estudio piloto en campo con la población estudiada, evidenció valores bastante elevados por serología en animales, con respecto a otros estudios encontrados en

países como Brasil o Costa Rica,^{83,84} a diferencia de humanos que no se encontró ninguno positivo; en este muestreo la coprología en ovinos dio 0% frente a un 66.6% de positividad con serología, una diferencia muy evidente que hace cuestionar la técnica o el muestreo, esto puede deberse al tamaño de la muestra que fue pequeña para los ovinos e incluso al momento de la toma de muestra, que se realizó en temporada seca, lo cual dificulta el hallazgo de los huevos en materia fecal por la misma naturaleza del ciclo de este parásito.

El hallazgo en el patrón de bandas específico de cada especie, tiene algunas semejanzas con algunos reportes realizados para bovinos^{79, 72} y humanos^{25, 69,80}. sin embargo, la cantidad de bandas por especie encontradas así como su calidad están en mejores condiciones, demostrando que la implementación de la metodología escogida fue certera y adecuada, además pueden observarse más claramente con el protocolo propuesto; el patrón observado es particularmente específico de esta región y no necesariamente debe comportarse igual en otros lugares donde se realice²⁷; la banda de 27 KDa que se comparte para las tres especies está en la literatura como una de las más frecuentemente reportada, sin embargo en conjunto cada especie tiene su patrón distintivo que facilita la confirmación respectiva.

Los resultados obtenidos de la investigación están en función de la caracterización epidemiológica de las Fasciolosis a nivel regional y nacional, contando con una técnica diagnóstica de mayor rapidez y sensibilidad que puede aportar a la solución de la problemática de los pequeños y medianos productores ganaderos, que ven afectada la rentabilidad de sus hatos de manera considerable; este aporte se ve evidenciado en la generación de un diagnóstico oportuno permitiendo el manejo adecuado y a tiempo, evitando colocarlos en desventajas competitivas frente al panorama económico del país.

La caracterización de esta parasitosis, contribuye a mejorar entre otros aspectos el conocimiento de las condiciones ambientales en las que esta situación es más factible, mostrando los posibles factores asociados o determinantes en los que habite la población que pueda estar más susceptible de sufrirla. En el ámbito social puede afectar positivamente a la comunidad ya que la enfermedad en los humanos aunque no se han reportado casos recientes en nuestro país, se sabe que todos los países fronterizos están afectados, y en el nuestro, el ciclo se ha mantenido en animales de regiones muy diversas, lo que ha expuesto al hombre en muchas formas ante el parásito y esta enfermedad tiene un comportamiento crónico y primordialmente asintomático pasando por desapercibida en la mayoría de los casos.

La utilización de métodos inmunológicos para establecer el diagnóstico de la Fasciolosis es justificado por la baja sensibilidad de los exámenes coprológicos en animales y humanos. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una de las pruebas más ampliamente usada pero su sensibilidad y especificidad dependen fundamentalmente de la calidad de los antígenos empleados; de ahí la importancia de seleccionar un buen antígeno para utilizar, los productos de E/S son considerados potentes inductores de la respuesta inmune humoral.

La aplicación de la herramienta como forma de tamizaje en la región seleccionada, encontró un número muy elevado de animales que han estado en contacto con el parásito en algún momento, adicional a esto la evidencia de la presencia de huevos en los exámenes coprológicos de muchos animales dan argumentos para sostener que la enfermedad se sigue manteniendo de manera constante y frecuente; por ende el riesgo al que están expuestos los humanos es alto y continuo.

Este trabajo permite a la Universidad Industrial de Santander ratificar su compromiso de extensión con la comunidad, ofreciendo el servicio de diagnóstico

serológico para los habitantes de las zonas rurales del departamento y a su respectivo ganado.

12. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones óptimas de la técnica de ELISA para realizarla de manera rutinaria en el laboratorio además de las condiciones necesarias para la realización del Western blot cuando se considere indispensable, lo que quiere decir que contamos con herramientas confiables para profundizar en la caracterización epidemiológica de la región ofreciendo el servicio para la comunidad y para la investigación.

Al aplicar esta herramienta diagnóstica en la provincia de García Rovira del departamento de Santander, se concluye que gran proporción de los animales que tiene para la productividad de la región están o han estado infestados con este parásito, las cifras de positividad tanto en suero como por coprología a manera general son elevadas, dando por hecho la necesidad de colocar en marcha ideas que aporten a la solución de este problema de manera eficaz y continua en pro del mejoramiento de la calidad de vida de los habitantes de estos sectores.

Para bovinos se pudo concluir que el patrón que mejor se reconoce para esta especie son el conformado por las bandas de 10, 27, 150 y 190 KDa; los ovinos comparten tres bandas de las cuatro que están en su patrón, diferenciándose porque los ovinos presentan una banda de 45 KDa en vez de una de 10 KDa como los bovinos. En el caso de los humanos solo comparten la de 27 KDa y las otras tres bandas son de 7, 8 y 41 KDa.

La sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas en el ELISA son bastante deseables, al igual que los puntos de corte establecidos para ellas, estableciendo un margen adecuado para eliminar la mayoría de los posibles falsos negativos y/o positivos; en cuanto las reacciones cruzadas estudiadas tenemos un número significativo de muestras testeadas con diferentes patologías, cuyas

etiologías son de agentes cercanos y lejanos filogenéticamente, haciendo más confiable la estandarización implementada.

FINANCIACIÓN

Este estudio fue realizado dentro del marco de dos proyectos: “Estudio de Fasciolosis ovina y bovina y búsqueda de posibles casos humanos en las veredas Carabobo, Cairasco, Listara, Anca, Jurado y Mortiño en la provincia de García Rovira del departamento de Santander”, financiado por la Universidad Industrial de Santander. Código: 5672. “Estudio de Fasciolosis ovina y bovina en las veredas Carabobo, Anca, Listara, Cairasco, Corralfalso y mortiño de la provincia García Rovira, Santander del sur”, financiado por Colciencias. Código: 1102-521-28902.

REFERENCIAS

1. CARRADA BRAVO Teodoro. Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos. En: Rev Gastro enterol Mex, 2003, Vol. 68 Num 2, Pp: 135-142.
2. FUENTES, MV., MALONE, JB., MAS-COMA, MS. Validation of a mapping and prediction model for human Fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. En: ActaTropica, 2001, 79 Pp: 87–95.
3. MAS-COMA, M., ESTEBAN, JG., BARGUES, M. Epidemiology of human Fascioliasis: a review and proposed new classification. En: Bulletin of the World Health Organization, 1999, 77 (4), Pp: 340-347.
4. CONCHEIRO, N. Fasciola y Fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parásitología con otras ciencias, En: Discurso de ingreso como Académico de Número, 2011, Santiago de Compostela, 214 pg.
5. MAS-COMA, S. Human Fascioliasis: Epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia, Southeast Asian. En: J Trop Med Public Health, 2004, Vol 35 (Suppl 1), Pp: 1-11.
6. FARAG, HF., BARAKAT, RM., RAGAB, M., OMAR, E. A focus of human Fascioliasis in the Nile Delta, Egypt. En: J TROP MED HYG, Sep- Oct 1979, 82 (9-10), Pp:188-190.
7. BENDEZÚ, P., FRAME, A., HILLYER, GV. Human Fascioliasis in Corozal, Puerto Rico. En: J Parásitol, Apr 1982, 68(2), Pp: 297-299.
8. LUIS, A, MARCOS., ANGÉLICA, TERASHIMA. Update on human Fascioliasis in Peru: diagnosis, treatment and clinical classification proposal. En: Neotrop. Helminthol, 2007, 1(2), Pp: 88-104.
9. JG, ESTEBAN., MD, BARGUES., P, BUCHON., M, FRANKEN., W, STRAUSS. The northern Bolivian Altiplano: region highly endemic for human Fascioliasis, En: Tropical Medicine and International Health, JUNE 1999, volume 4 No 6, Pp: 454 – 467.

10. JG, ESTEBAN., ANGELA, FLARES., RENK, ANGLES., MAS-COMA, S. High endemicity of human Fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley Bolivia. En: Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, 1999, 93, Pp: 151 - 156.
11. JOSÉ, R., ESPINOZA, Angélica., TERASHIMA, Patricia., HERRERA-VELIT., Luis, MARCOS. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. En: Rev Perú MedExp Salud Pública, 2010, 27(4), Pp: 604-612.
12. MA, VALERO., FM, UBEIRA., M, KHOUBBANE., P, ARTIGAS., L, MUIÑO., M, MEZO., et al. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with Fasciola hepatica and F. gigantica. En: Veterinary Parasitology, 2009, 159, Pp: 77–81.
13. M, MESO., R, SÁNCHEZ., AJ, MARTÍNEZ., N, DÍAZ., P, DÍAZ., P, MORRONDO. Fasciolosis bovina: valoración de parámetros parasitarios y de respuestas inmunitarias en infecciones experimentales y naturales. En: VetMex, 1998, 29 (1), Pp: 75-81.
14. H, CAWDERY., MJ, STICKLAND., KL, CONWAY., A, CROWE. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. En: The British Veterinary Journal, 1977, 133, Pp: 145-159.
15. CAWDERY, MJ. Review of economic importance of Fasciolosis in sheep and cattle. En: Irish Veterinary News, 1984, Pp: 14-22.
16. BEHM, C., Sangester, Dalton, J.P. Fasciolosis, N. Pathology, Pathphysiology and Clinical Aspects. En: Dublin (Ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp 185-217.
17. TORGERSON, P., CLAXTON, J. Epidemiology and control. En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublin (Ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp 113-149.
18. GÓMEZ, B, M., ROJO, V, F, A. Fasciolosis: Etiología y Biología. En: Ovis 1994, 34, Pp: 11-19.

19. GUPTA, RK., Siber, GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. En: Vaccine, 1995, 13, Pp: 1263-1276.
20. CHEN, MG., MOTT, KE. Progress in assessment for morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature. En: Trop Dis Bull, 1990, 87 Pp: 1-38.
21. NELSON, URIBE, DELGADO. Inmunoprotección contra Fasciola hepatica utilizando antígenos nativos (Fh6A y FhMM3) y recombinantes (FhSAP-2) con potencial capacidad protectora, (Tesina). Universidad de Salamanca. Facultad de Farmacia. España. 2005.
22. M, RAYMUNDO., M, FLORES., T, IWASHITA., S, CUBA., G, HERENCIA. Características clínicas de la infección crónica por Fasciola hepatica en niños. En: Rev. Gastroenterol, Perú v.22 n.3 Lima jul./set. 2002, vol.22, no.3. ISSN 1022-5129, Pp: 228-233
23. LLOP, A., VALDES, M., ZUAZO, J. Microbiología, parasitología médicas. En : La Habana, Editorial Ciencias Médicas, 2001, tomo III, Pp: 381-388.
24. SALOMON, MC., DE, JONG, L., TONELLI, RL., BORREMANS, CG., BERTELLO, D., JOFRE, CA., et al. Confirmación etiológica de un brote de distomatosis hepática en Mendoza. En : XII Jornadas Argentinas de Microbiología. Argentina, Junio, 2006, Resúmenes de las Comunicaciones, 108, Pp: 59-68.
25. ALARCON, DE NOYA., ROJAS, E., COLMENARES, C., MORALES, C., CONTRERAS, R., VALERO, S. Brote familiar de fasciolosis en Venezuela. En: boletín de Malariología y salud ambiental. enero –julio, 2007, Vol XLVII, 47(1) Pp: 47-54.
26. D, LOJA., J, ALVIZURI., M, VILCA., R, AVILES., M, SANCHEZ. Hematoma hepático subcapsular por fasciola. En: Rev. Gastroenterol. Perú; 2003, 23 Pp: 142-148.
27. COLMENARES, C., CASTELLANO, A., MEDEZ, L., BRUCES, A., GARCIA, F., ALARCAON, De Noya, B. Inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina y humana

- en Venezuela. En : Acta Científica Venezolana, 2003, 54 (Sup. 1), /221, Pp: 103-106.
28. C, COLMENARES., L, MENDEZ., Z, DIAZ-BELLO., B, ALARCON, DE NOYA. Antígeno excreción-secreción de Fasciola hepatica: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico Fasciola hepatica excretion-secretion antigen: ultrafiltration and application in inmunodiagnosis. En : Acta BioquímClínLatinoam, 2007, 41 (2), Pp: 259-66.
 29. TAIRA, N., YOSHIFUJI, H., BORAY, JC. Zoonotic potential of infection with Fasciola spp. by consumption of freshly prepared raw liver containing Immature flukes. En : International Journal of parasitology, 1997, 27 Pp: 775-779.
 30. GT, NGUYENA., TH, LEB., THT, DAOA., TLH, TRANC., N, PRAETD., N, SPEYBROECKD., et al. Bovine Fasciolosis in the human Fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in Central Vietnam. En : Acta Tropica 2011, 117 Pp : 19–22.
 31. ANDREWS, Stuart. Fasciolosis humana, En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublín (Ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp: 1-21.
 32. GÓMEZ, BAUTISTA, M., ROJO, VÁZQUEZ, FA. Fasciolosis: Tratamiento, profilaxis y control. En: Ovis 1994; 34 Pp: 53-59.
 33. MANGA, MY. Trematodos. En Cordero del Campillo M., y ROJO, VÁZQUEZ. En: Parásitología Veterinaria. Madrid. 1ª ED 2ª Reimpr McGraw-Hill Interamericana, 2000, Pp: 79-103.
 34. MANGA, MY., GONZÁLEZ, MC., DEL POZO, HIDALGO, R. Kinetics of Fasciola hepatica egg passage in the feces of sheep in the Porma basin, León Spain. En: Acta Parasitol Pol, 1990, 35 Pp: 149-157.
 35. 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. En: Vet Parasitol, 2000, 87 Pp: 103-123.

36. CLERY, D., TORGERSON, P., MULCAHY, G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. En: *Vet Parasitol*, 1996, 62 Pp: 71-82.
37. HAROUN, EM., HAMMOND, JA., SEWELL, MM. Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following sensitising infection and treatment. En: *Res Vet Science*, 1980, 28 Pp: 377-379.
38. MURO, A., RAMAJO, V., LOPEZ, J., SIMON, F., HILLYER, GV. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. En : *Vet Parasitol*, 1997, 69 Pp: 219-229.
39. CASANUEVA, P., HILLYER, GV., RAMAJO, V., OLEAGA, A., MURO, A. Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. En: *J Parasitol*, 2001; 87 Pp: 697-700.
40. CHAUVIN, A., BOUVET, G., BOULARDS, C. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. En: *Inter J Parasitol*, 1995; 25 Pp: 1227-1241.
41. FERRE, I., ORTEGA-MORA, LM., ROJO-VÁZQUEZ, FA. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. En: *Vet Parasitology*, 1997, 68 Pp: 261-267.
42. 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. En: *Parasitol Res*, 1997, 83 Pp: 680-686.
43. MARTÍNEZ-MORENO, AR., JIMÉNEZ-LUQUE, V., CÁMARA, S., MARTÍNEZ-MORENO, FJ., ACOSTA, I., HERNÁNDEZ, S. Oxidative response during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secondarily *Fasciola hepatica* infected goats. En: *Int J Parasitol*, 2000; 30 Pp: 1013-1017.
44. POITOU, I., BAEZA, E., BOULARD, C. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats

- during primary infestation with *Fasciola hepatica*. En: *Vet Parasitol*, 1993, 49 Pp: 179-190.
45. MULCAY, G., JOYCE, P., DALTON, J. Immunology of *F. hepatica* infection. En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublin (ireland) 1^o ED, CABI Publishing. 1999. Pp: 411-430.
 46. SAMPAIO, SILVA, MC., VINDIMIAN, M., WATTRE, P., CAPRON, A. IgE antibodies in human *Fasciola hepatica* distomiasis. En: *Pathol Biol*, 1985, 33 Pp: 746-750.
 47. PAILLER, S., PUYGAUTHIER-TOUBAS, D., BONNIN, A., MARX-CHEMLA, C., CAMERLYNCK, P., THOANNES, H. Characterization isotypique des anticorps spécifiques dans la distomatose humaine a *Fasciola hepatica*. En : *Méd Malad Infect*, 1990, 20 Pp: 177-181.
 48. MAHER, K., EL RIDI, R., ELHODA, AN., EL-GHANNAM, M., SHAHEEN, H., SHAKER, Z., HASSANEIN, HI. Parasite-specific, antibody profile in human fascioliasis: application for immunodiagnosis of infection. En: *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61 Pp: 738-742.
 49. VAN, MILIGEN, FJ., CORNELISSEN, JB., BOKHOUT, BA. *Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an immunoreactive 32-kDa protein, induces strong protective immunity in rats. En: *Exp Parasitol*, 2000, 94 Pp: 163-171.
 50. WICKI, P. SCHWALBACH, B., CHARBON, JL., STEINER, A., LANG, M., PFISTER, K. Intestinal cellular react. Location of induction and expression of protective immunity against *Fasciola hepatica* at the gut level: a study using an ex vivo infection model with ligated gut segments. En: *J Parasitol*, 1998; 84 Pp: 771-777.
 51. MASI, DT., CERVI, L., CASADO, JM. Modification of accessory activity of peritoneal cells from *Fasciola hepatica* infected rats. En: *Vet Immunol Immunopathol*, 1996, 53 Pp: 257-268.

52. CERVI, L., CEJAS, H., MASI, D.T. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. En: Int J Parasitol, 2001, 31 Pp: 1467-1473.
53. KEEGAN, P.S., TRUDGETT, A. Fasciola hepatica in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. En: Parasite Immunol, 1992, 14 Pp: 657-669.
54. TLIBA, O., MOIRE, N., LE VERN, Y., BOULARD, C., CHAUVIN, A., SIBILLE, P. Early hepatic immune response in rats with Fasciola hepatica. En: Vet Res 2002, 33 Pp: 261-270.
55. DALTON, J.P., ROBINSON, M.W., MULCAHY, G., O'NEILL, S.M., DONNELLY, S. Immunomodulatory molecules of Fasciola hepatica: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. En: Vet Parasitol, 2013, Aug 1, 195(3-4):272-85, Pp: 272-285.
56. MEEUSEN, E., LEE, C.S., RICKARD, M.D., BRANDON, M.R. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. En: Parasite Immunol, 1995, 17 Pp: 37-45.
57. MULCAY, G., JOYCE, P., DALTON, J. Immunology of F. hepatica infection. En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublin (ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp: 411-430.
58. LAW, H.P., SMOOKER, M., IRVING, A., PIEDRAFITA, D., PONTING, R., KENEDY, N.J., WHISSTOCK, J., PIKE, R.N., SPITHILL, T.W. Cloning an Expression of the Major Secreted Cathesin B-Like Protein from Juvenile F. hepatica and Analisis of Immunogenicity following Liver Fluke Infection. En: Infection and Immunity, 2003, 71 Pp:6921-6932.
59. WILCHES, Christian., JARAMILLO, Juan., MUÑOZ, Diana., ROBLEDO, Sara., VELEZ, Ivan. Presence of infection by Fasciola hepatica in inhabitants from the valle de San Nicolás, eastern Antioquia. En : Asociación Colombiana de Infectología, Revista Infectio, Junio de 2009, Volumen 13 No 2 Pp: 92-99.

60. ARJONA, R., RIANCHO, JA., AGUADO, JM., SALESA, R., GONZALEZ, MACIAS, J. Fasciolosis in developed countries.: A review of Classic and aberrant forms of the disease. En: *Medicine (Balt)* 1995, 74(1), Pp: 13-23.
61. URIBE, Nelson., SIERRA-BALCÁRCEL, Raúl., ESPINOSA, Cindy. Comparación de las técnicas Kato-Katz, TSET y TSR en el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos. En: *Rev. Univ. Ind. Santander. Bucaramanga* Sept/Dec., 2012, ISSN 2145-8464, Salud vol.44 no.3 Pp. 7-12.
62. HILLYER, GV. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. En Dalton J.P. *Fasciolosis*. En: Dublin (ireland) 1º ED, CABI Publishing. 1999. Pp: 435-447.
63. ESPINO, AM., MARCET, R., FINLAY, CM. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. En: *J Clin Microbio.*, 1990, Dec; 28(12) Pp:2637-40.
64. SANCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., SUAREZ, JL., PANADERO, R., PEDREIRA, J., DIEZ-BANOS, P., MORRONDO, P. Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. En: *Parásitol Res.*, 2001, Aug; 87(8), Pp: 609-614.
65. ESPINO, AM., AND HILLYER, GV. Molecular cloning of a member of the *F. hepatica* Saposin-like protein family. En: *J. Parasitology*, 2003, 89(3) 545-552.
66. MARCILLA, A., BARGUES, MD., MAS-COMA, S. A PCR-RFPL assay for the distinction between *F. hepatica* and *F. gigantica*. En: *Moll Cell Probes*, 2002, 5 Pp: 327-333.
67. MEZO, M., GONZALEZ-WARLETA, M., UBEIRA, FM. Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. En: *J Parasitol.* 2003, DOI:10.1645/GE-74RI.1, 89(4) Pp: 843-849.
68. CORNELISSEN, JB., DE LEEUW., WA, VAN DER., HEIJDEN, PJ. Comparison of an indirect haemagglutination assay and an ELISA for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep. En: *Vet Q.*, 1992, ABSTRAC. Dec; 14(4) Pp:152-156.

69. FIGUEROA-SANTIAGO, O., DELGADO, B., ESPINO, AM. Fasciola hepatica saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. En: *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2011, Jul;70(3) Pp:355-361.
70. INTAPAN, PAM., MALEEWONG, W., NATEEWORANART, S., WONGKHAM, C., PIPITGO, SUKOLAPONG, V., SANMANEEDET, S. Immunodiagnosis of human fasciolosis using an antigen of Fasciola gigantica adult worm with the molecular mass of 27kDa by a dot-ELISA. En: *J Trop Med Public Health, ABSTRAC*, 2003 Dec; 34(4) Pp:713-717.
71. ROKNI, MB., MASSOUD, J., HANILO, A. Comparison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of F.gigantica in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnostic of human fasciolosis. En: *Acta tropica*, 2003, 89 Pp: 69-75.
72. NEYRA, V., CHAVARRI, E., ESPINOZA, JR. Cysteine proteinases Fas 1 and Fas 2 are diagnostic markers for Fasciola hepatica infection in alpacas (Lama pacos). En: *Veterinary Parasitology*, 2002, 105 Pp: 21-32.
73. VARGAS, L., DANILO, DEL PINO., A, SILVIA., GONZALEZ, I., CARMEN, GLORIA. y VIDAL, MACARENA. Implementación de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la Fascioliasis equina. En: *Bol. Chil. parasitol.*, 2001, vol.56, n.3-4, Pp. 91-94.
74. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. En: *Anal biochem.*, 1976, 72 Pp: 245 - 248.
75. HILLYER, G.V. Serological diagnosis of Fasciola hepatica. En: *Parásitología al Día*, 1993, 17, Pp: 130 - 136.
76. ESPINO, A.M., DUMÉNIGO, B., FERNÁNDEZ, R.. FINLAY, C. Immunodiagnosis of human Fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products. En: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 37, Pp: 605 - 608.
77. SANCHEZ, A., R, PAZ SILVA., A, SUAREZ., J, PANADERO., R, DIEZ – BAÑOS., et al. Use of a sandwich - enzyme linked immunosorbent assay

- (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). En: *Veterinary Parasitology*, 2000, 93 Pp: 39 – 46
78. Guía para la elaboración de las consideraciones éticas en la investigación con seres humanos/no humanos. En: Comité de ética para la investigación científica Facultad de Salud UIS, CEINCI.
79. ORTIZ, PL., CLAXTON, JR., CLARKSON, MJ., MCGARRY, J., WILLIAMS, DJ. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. En: *Vet Parasitol.*, 2000, Nov 10;93(2) Pp:121-134.
80. FREITES, Azael., COLMENARES, Cecilia., ALARCÓN-NOYA, Belkisyolé., GARCÍA, María Eugenia. Fasciolosis humana en el municipio Mara estado Zulia Venezuela: prevalencia y factores asociados. En: *Invest. clín, dic. tab.* 2009, 50(4) Pp:497-506.
81. LI E, Olga., LEGUÍA, P, Guillermo., ESPINO, M, Ana., DUMÉNIGO, R, Blanca., DÍAZ, E, Ailén., OTERO Oscar. Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas naturalmente infectadas. En: *RevInvVet Perú*, 2005, 16 (2) Pp: 143-153.
82. Ana, M, Espino., Amarilys, Borges,. y Blanca, E, Duménigo. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 7(4), 2000. Pp: 225 -231.
83. Alves DP., Carneiro, MB., Martins, IV., Bernardo, CC., Donatele, DM., Pereira, Júnior, OS,. Almeida, BR,. Avelar, BR,. Leão, AGC,. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* vol.17 no.3 Botucatu 2011.
84. Carlos, Ernesto, Alpizar,. Jaqueline, Bianque,. Ana, Jiménez,. Jorge, Hernández,. Alexis, Berrocal,. Juan, Romero. *Fasciola hepatica* EN GANADO BOVINO DE CARNE EN SIQUIRRES Y LESIONES ANATOMO-HISTOPATOLÓGICAS DE HÍGADOS BOVINOS DECOMISADOS EN

MATADEROS DE COSTA RICA. *Agronomía Costarricense* 37(2): 7-16.
ISSN:0377-9424 / 2013. Pp: 7-16.

BIBLIOGRAFIA

- ALARCON, DE NOYA., ROJAS, E., COLMENARES, C., MORALES, C., CONTRERAS, R., VALERO, S. Brote familiar de fasciolosis en Venezuela. En: boletín de Malariología y salud ambiental. enero –julio, 2007, Vol XLVII, 47(1) Pp: 47-54.
- Alves DP., Carneiro, MB., Martins, IV., Bernardo, CC., Donatele, DM., Pereira, Júnior, OS., Almeida, BR., Avelar, BR., Leão, AGC,. Distribution and factors associated with Fasciola hepatica infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis vol.17 no.3 Botucatu 2011.
- Ana, M, Espino., Amarilys, Borges,. y Blanca, E, Duménigo. Coproantígenos de Fasciola hepatica de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 7(4), 2000. Pp: 225 -231.
- ANDREWS, Stuart. Fasciolosis humana, En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublín (Ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp: 1-21.
- ARJONA, R., RIANCHO, JA., AGUADO, JM., SALESA, R., GONZALEZ, MACIAS, J. Fasciolosis in developed countries.: A review of Classic and aberrant forms of the disease. En: Medicine (Balt) 1995, 74(1), Pp: 13-23.
- BEHM, C., Sangester, Dalton, J.P. Fasciolosis, N. Pathology, Pathphysiology and Clinical Aspects. En: Dublin (Ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp 185-217.
- BENDEZÚ, P., FRAME, A., HILLYER, GV. Human Fascioliasis in Corozal, Puerto Rico. En: J Parasitol, Apr 1982, 68(2), Pp: 297-299.
- 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. En: Vet Parasitol, 2000, 87 Pp: 103-123.

- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. En: Anal biochem., 1976, 72 Pp: 245 - 248.
- C, COLMENARES., L, MENDEZ., Z, DIAZ-BELLO., B, ALARCON, DE NOYA. Antígeno excreción-secreción de Fasciola hepatica: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico Fasciola hepatica excretion-secretion antigen: ultrafiltration and application in inmunodiagnosis. En : Acta BioquímClínLatinoam, 2007, 41 (2), Pp: 259-66.
- Carlos, Ernesto, Alpízar,. Jaqueline, Bianque,. Ana, Jiménez,. Jorge, Hernández,. Alexis, Berrocal,. Juan, Romero. Fasciola hepatica EN GANADO BOVINO DE CARNE EN SIQUIRRES Y LESIONES ANATOMO-HISTOPATOLÓGICAS DE HÍGADOS BOVINOS DECOMISADOS EN MATADEROS DE COSTA RICA. Agronomía Costarricense 37(2): 7-16. ISSN:0377-9424 / 2013. Pp: 7-16.
- CARRADA BRAVO Teodoro. Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos. En: Rev Gastro enterol Mex, 2003, Vol. 68 Num 2, Pp: 135-142.
- CASANUEVA, P., HILLYER, GV., RAMAJO, V., OLEAGA, A., MURO, A. Immunoprophylaxis against Fasciola hepatica in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. En: J Parasitol, 2001; 87 Pp: 697-700.
- CAWDERY, MJ. Review of economic importance of Fasciolosis in sheep and cattle. En: Irish Veterinary News, 1984, Pp: 14-22.
- CERVI, L., CEJAS, H., MASIH, DT. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. En: Int J Parasitol, 2001, 31 Pp: 1467-1473.
- CHAUVIN, A., BOUVET, G., BOULARDS, C. Humoral an cellular immune responses to Fasciola hepatica experimental primary and secondary infection in sheep. En: Inter J Parasitol, 1995; 25 Pp: 1227-1241.
- CHEN, MG., MOTT, KE. Progress in assessment for morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature. En: Trop Dis Bull, 1990, 87 Pp: 1-38.

- CLERY, D., TORGERSON, P., MULCAHY, G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. En: *Vet Parasitol*, 1996, 62 Pp: 71-82.
- COLMENARES, C., CASTELLANO, A., MEDEZ, L., BRUCES, A., GARCIA, F., ALARCAON, De Noya, B. Inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina y humana en Venezuela. En : *Acta Científica Venezolana*, 2003, 54 (Sup. 1), /221, Pp: 103-106.
- CONCHEIRO, N. *Fasciola* y Fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias, En: *Discurso de ingreso como Académico de Número*, 2011, Santiago de Compostela, 214 pg.
- CORNELISSEN, JB., DE LEEUW., WA, VAN DER., HEIJDEN, PJ. Comparison of an indirect haemagglutination assay and an ELISA for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep. En: *Vet Q.*, 1992, ABSTRAC. Dec; 14(4) Pp:152-156.
- D, LOJA., J, ALVIZURI., M, VILCA., R, AVILES., M, SANCHEZ. Hematomahepáticosubcapsularporfasciola. En: *Rev. Gastroenterol. Perú*; 2003, 23 Pp: 142-148.
- DALTON, JP., ROBINSON, MW., MULCAHY, G., O'NEILL, SM., DONNELLY, S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. En: *Vet Parasitol*, 2013, Aug 1, 195(3-4):272-85, Pp: 272–285.
- ESPINO, A.M., DUMÉNIGO, B., FERNÁNDEZ, R.. FINLAY, C. Immunodiagnosis of human Fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products. En: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 37, Pp: 605 - 608.
- ESPINO, AM., AND HILLYER, GV. Molecular cloning of a member of the *F. hepatica* Saposin-like protein family. En: *J. Parasitology*, 2003, 89(3) 545-552.

- ESPINO, AM., MARCET, R., FINLAY, CM. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. En: J Clin Microbio., 1990, Dec; 28(12) Pp:2637-40.
- FARAG, HF., BARAKAT, RM., RAGAB, M., OMAR, E. A focus of human Fascioliasis in the Nile Delta, Egypt. En: J TROP MED HYG, Sep- Oct 1979, 82 (9-10), Pp:188-190.
- FERRE, I., ORTEGA-MORA, LM., ROJO-VÁZQUEZ, FA. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical Fasciola hepatica infection in sheep. En: Vet Parasitology, 1997, 68 Pp: 261-267.
- FIGUEROA-SANTIAGO, O., DELGADO, B., ESPINO, AM. Fasciola hepatica saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. En: Diagn Microbiol Infect Dis., 2011, Jul;70(3) Pp:355-361.
- FREITES, Azael., COLMENARES, Cecilia., ALARCÓN-NOYA, Belkisyolé., GARCÍA, María Eugenia. Fasciolosis humana en el municipio Mara estado Zulia Venezuela: prevalencia y factores asociados. En: Invest. clín, dic. tab. 2009, 50(4) Pp:497-506.
- FUENTES, MV., MALONE, JB., MAS-COMA, MS. Validation of a mapping and prediction model for human Fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. En: ActaTropica, 2001, 79 Pp: 87–95.
- GÓMEZ, B, M., ROJO, V, F, A. Fasciolosis: Etiología y Biología. En: Ovis 1994, 34, Pp: 11-19.
- GÓMEZ, BAUTISTA, M., ROJO, VÁZQUEZ, FA. Fasciolosis: Tratamiento, profilaxis y control. En: Ovis 1994; 34 Pp: 53-59.
- GT, NGUYENA., TH, LEB., THT, DAOA., TLH, TRANC., N, PRAETD., N, SPEYBROECKD., et al. Bovine Fasciolosis in the human Fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in Central Vietnam. En : Acta Tropica 2011, 117 Pp : 19–22.

- Guía para la elaboración de las consideraciones éticas en la investigación con seres humanos/no humanos. En: Comité de ética para la investigación científica Facultad de Salud UIS, CEINCI.
- GUPTA, RK., Siber, GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. En: Vaccine, 1995, 13, Pp: 1263-1276.
- H, CAWDERY., MJ, STICKLAND., KL, CONWAY., A, CROWE. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. En: The British Veterinary Journal, 1977, 133, Pp: 145-159.
- HAROUN, EM., HAMMOND, JA., SEWELL, MM. Resistance to Fasciola hepatica in rats and rabbits following sensitising infection and treatment. En: Res Vet Science, 1980, 28 Pp: 377-379.
- HILLYER, G.V. Serological diagnosis of Fasciola hepatica. En: Parasitología al Día, 1993, 17, Pp: 130 - 136.
- HILLYER, GV. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublin (Ireland) 1^o ED, CABI Publishing. 1999. Pp: 435-447.
- INTAPAN, PAM., MALEEWONG, W., NATEEWORANART, S., WONGKHAM, C., PIPITGO, SUKOLAPONG, V., SANMANEEDET, S. Immunodiagnosis of human fasciolosis using an antigen of Fasciola gigantica adult worm with the molecular mass of 27kDa by a dot-ELISA. En: J Trop Med Public Health, ABSTRAC, 2003 Dec; 34(4) Pp:713-717.
- JG, ESTEBAN., ANGELA, FLARES., RENK, ANGLES., MAS-COMA, S. High endemicity of human Fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley Bolivia. En: Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, 1999, 93, Pp: 151 - 156.
- JG, ESTEBAN., MD, BARGUES., P, BUCHON., M, FRANKEN., W, STRAUSS. The northern Bolivian Altiplano: region highly endemic for human Fascioliasis, En: Tropical Medicine and International Health, JUNE 1999, volume 4 No 6, Pp: 454 – 467.

- JOSÉ, R., ESPINOZA, Angélica., TERASHIMA, Patricia., HERRERA-VELIT., Luis, MARCOS. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. En: Rev Perú MedExp Salud Pública, 2010, 27(4), Pp: 604-612.
- KEEGAN, PS., TRUDGETT, A. Fasciola hepatica in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. En: Parasite Immunol, 1992, 14 Pp: 657-669.
- LAW, HP., SMOOKER, M., IRVING, A., PIEDRAFITA, D., PONTING, R., KENEDY, NJ., WHISSTOCK, J., PIKE, RN., SPITHILL, TW. Cloning an Expression of the Major Secreted Cathesin B-Like Protein from Juvenile F. hepatica and Analisis of Inmunogenicity following Liver Fluke Infection. En: Infection and Immunity, 2003, 71 Pp:6921-6932.
- LI E, Olga., LEGUÍA, P, Guillermo., ESPINO, M, Ana., DUMÉNIGO, R, Blanca., DÍAZ, E, Ailén., OTERO Oscar. Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de Fasciola hepatica en alpacas naturalmente infectadas. En: RevInvVet Perú, 2005, 16 (2) Pp: 143-153.
- LLOP, A., VALDES, M., ZUAZO, J. Microbiología, parasitología médicas. En : La Habana, Editorial Ciencias Médicas, 2001, tomo III, Pp: 381-388.
- LUIS, A, MARCOS., ANGÉLICA, TERASHIMA. Update on human Fascioliasis in Peru: diagnosis, treatment and clinical classification proposal. En: Neotrop. Helminthol, 2007, 1(2), Pp: 88-104.
- M, MESO., R, SÁNCHEZ., AJ, MARTÍNEZ., N, DÍAZ., P, DÍAZ., P, MORRONDO. Fasciolosis bovina: valoración de parámetros parasitarios y de respuestas inmunitarias en infecciones experimentales y naturales. En: VetMex, 1998, 29 (1), Pp: 75-81.
- M, RAYMUNDO., M, FLORES., T, IWASHITA., S, CUBA., G, HERENCIA. Características clínicas de la infección crónica por Fasciola hepatica en niños. En: Rev. Gastroenterol, Perú v.22 n.3 Lima jul./set. 2002, vol.22, no.3. ISSN 1022-5129, Pp: 228-233

- MA, VALERO., FM, UBEIRA., M, KHOUBBANE., P, ARTIGAS., L, MUIÑO., M, MEZO., et al. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. En: *Veterinary Parasitology*, 2009, 159, Pp: 77–81.
- MAHER, K., EL RIDI, R., ELHODA, AN., EL-GHANNAM, M., SHAHEEN, H., SHAKER, Z., HASSANEIN, HI. Parasite-specific, antibody profile in human fascioliasis: application for immunodiagnosis of infection. En: *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61 Pp: 738-742.
- MANGA, MY. Trematodos. En Cordero del Campillo M., y ROJO, VÁZQUEZ. En: *Parásitología Veterinaria*. Madrid. 1ª ED 2ª Reimpr McGraw-Hill Interamericana, 2000, Pp: 79-103.
- MANGA, MY., GONZÁLEZ, MC., DEL POZO, HIDALGO, R. Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the feces of sheep in the Porma basin, León Spain. En: *Acta Parasitol Pol*, 1990, 35 Pp: 149-157.
- MARCILLA, A., BARGUES, MD., MAS-COMA, S. A PCR-RFPL assay for the distinction between *F. hepatica* and *F. gigantica*. En: *Moll Cell Probes*, 2002, 5 Pp: 327-333.
- 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. En: *Parásitol Res*, 1997, 83 Pp: 680-686.
- MARTÍNEZ-MORENO, AR., JIMÉNEZ-LUQUE, V., CÁMARA, S., MARTÍNEZ-MORENO, FJ., ACOSTA, I., HERNÁNDEZ, S. Oxidative response during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secondarily *Fasciola hepatica* infected goats. En: *Int J Parasitol*, 2000; 30 Pp: 1013-1017.
- MAS-COMA, M., ESTEBAN, JG., BARGUES, M. Epidemiology of human Fascioliasis: a review and proposed new classification. En: *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77 (4), Pp: 340-347.

- MAS-COMA, S. Human Fascioliasis: Epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia, Southeast Asian. En: J Trop Med Public Health, 2004, Vol 35 (Suppl 1), Pp: 1-11.
- MASIH, DT., CERVI, L., CASADO, JM. Modification of accessory activity of peritoneal cells from *Fasciola hepatica* infected rats. En: Vet Immunol Immunopathol, 1996, 53 Pp: 257-268.
- MEEUSEN, E., LEE, CS., RICKARD, MD., BRANDON, MR. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. En: Parasite Immunol, 1995, 17 Pp: 37-45.
- MEZO, M., GONZALEZ-WARLETA, M., UBEIRA, FM. Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. En: J Parasitol. 2003, DOI:10.1645/GE-74RI.1, 89(4) Pp: 843-849.
- MULCAY, G., JOYCE, P., DALTON, J. Immunology of *F. hepatica* infection. En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublin (ireland) 1º ED, CABI Publishing. 1999. Pp: 411-430.
- MULCAY, G., JOYCE, P., DALTON, J. Immunology of *F. hepatica* infection. En Dalton J.P. Fasciolosis. En: Dublin (ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp: 411-430.
- MURO, A., RAMAJO, V., LOPEZ, J., SIMON, F., HILLYER, GV. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. En : Vet Parasitol, 1997, 69 Pp: 219-229.
- NELSON, URIBE, DELGADO. Inmunoprotección contra *Fasciola hepatica* utilizando antígenos nativos (Fh6A y FhMM3) y recombinantes (FhSAP-2) con potencial capacidad protectora, (Tesina). Universidad de Salamanca. Facultad de Farmacia. España. 2005.
- NEYRA, V., CHAVARRI, E., ESPINOZA, JR. Cysteine proteinases Fas 1 and Fas 2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). En: Veterinary Parasitology, 2002, 105 Pp: 21-32.

- ORTIZ, PL., CLAXTON, JR., CLARKSON, MJ., MCGARRY, J., WILLIAMS, DJ. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. En: *Vet Parasitol.*, 2000, Nov 10;93(2) Pp:121-134.
- PAILLER, S., PUYGAUTHIER-TOUBAS, D., BONNIN, A., MARX-CHEMLA, C., CAMERLYNCK, P., THOANNES, H. Characterization isotypique des anticorps spécifiques dans la distomatose humaine a *Fasciola hepatica*. En : *Méd Malad Infect*, 1990, 20 Pp: 177-181.
- POITOU, I., BAEZA, E., BOULARD, C. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. En: *Vet Parasitol*, 1993, 49 Pp: 179-190.
- ROKNI, MB., MASSOUD, J., HANILO, A. Comparison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *F.gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnostic of human fasciolosis. En: *Acta tropica*, 2003, 89 Pp: 69-75.
- SALOMON, MC., DE, JONG, L., TONELLI, RL., BORREMANS, CG., BERTELLO, D., JOFRE, CA., et al. Confirmación etiológica de un brote de distomatosis hepática en Mendoza. En : XII Jornadas Argentinas de Microbiología. Argentina, Junio, 2006, Resúmenes de las Comunicaciones, 108, Pp: 59-68.
- SAMPAIO, SILVA, MC., VINDIMIAN, M., WATTRE, P., CAPRON, A. IgE antibodies in human *Fasciola hepatica* distomiasis. En: *Pathol Biol*, 1985, 33 Pp: 746-750.
- SANCHEZ, A., R, PAZ SILVA., A, SUAREZ., J, PANADERO., R, DIEZ – BAÑOS., et al. Use of a sandwich - enzyme linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). En: *Veterinary Parasitology*, 2000, 93 Pp: 39 – 46
- SANCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., SUAREZ, JL., PANADERO, R., PEDREIRA, J., DIEZ-BANOS, P., MORRONDO, P. Effect of fasciolicides on

- the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. En: *Parásitol Res.*, 2001, Aug; 87(8), Pp: 609-614.
- TAIRA, N., YOSHIFUJI, H., BORAY, JC. Zoonotic potential of infection with *Fasciola* spp. by consumption of freshly prepared raw liver containing Immature flukes. En : *International Journal of parasitology*, 1997, 27 Pp: 775-779.
 - TLIBA, O., MOIRE, N., LE VERN, Y., BOULARD, C., CHAUVIN, A., SIBILLE, P. Early hepatic immune response in rats with *Fasciola hepatica*. En: *Vet Res* 2002, 33 Pp: 261-270.
 - TORGERSON, P., CLAXTON, J. Epidemiology and control. En Dalton J.P. *Fasciolosis*. En: Dublin (Ireland) 1º ED, CABI Publishing, 1999, Pp 113-149.
 - URIBE, Nelson., SIERRA-BALCÁRCEL, Raúl., ESPINOSA, Cindy. Comparación de las técnicas Kato-Katz, TSET y TSR en el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos. En: *Rev. Univ. Ind. Santander. Bucaramanga* Sept/Dec., 2012, ISSN 2145-8464, Salud vol.44 no.3 Pp. 7-12.
 - VAN, MILIGEN, FJ., CORNELISSEN, JB., BOKHOUT, BA. *Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an immunoreactive 32-kDa protein, induces strong protective immunity in rats. En: *Exp Parasitol*, 2000, 94 Pp: 163-171.
 - VARGAS, L., DANILO, DEL PINO., A, SILVIA., GONZALEZ, I., CARMEN, GLORIA. y VIDAL, MACARENA. Implementación de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la Fascioliasis equina. En: *Bol. Chil. parasitol.*, 2001, vol.56, n.3-4, Pp. 91-94.
 - WICKI, P. SCHWALBACH, B., CHARBON, JL., STEINER, A., LANG, M., PFISTER, K. Intestinal cellular react. Location of induction and expression of protective immunity against *Fasciola hepatica* at the gut level: a study using an ex vivo infection model with ligated gut segments. En: *J Parasitol*, 1998; 84 Pp: 771-777.
 - WILCHES, Christian., JARAMILLO, Juan., MUÑOZ, Diana., ROBLEDO, Sara., VELEZ, Ivan. Presence of infection by *Fasciola hepatica* in inhabitants from the

valle de San Nicolás, eastern Antioquia. En : Asociación Colombiana de Infectología, Revista Infectio, Junio de 2009, Volumen 13 No 2 Pp: 92-99.

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento Informado (Toma de Muestras Animales)

Con base en los principios establecidos en la Resolución 008430 de 4 de octubre de 1993 por la cual se establecen las normas para la investigación en salud, específicamente en el artículo 15, en lo relacionado con el Consentimiento Informado y la ley 84 de 1989 sobre la protección de los animales en investigación; usted deberá conocer acerca de este estudio y aceptar participar en ella si lo considera conveniente. Por favor lea con cuidado y haga las preguntas que desee hasta su total comprensión.

La Fasciolosis es causada por un gusano llamado *Fasciola hepática*, conocida también con el nombre de Mariposa. Es una enfermedad que afecta principalmente al ganado ovino y vacuno causando graves pérdidas económicas.

Su participación en este estudio consistirá en lo siguiente:

- Darnos información relacionada con Mariposa en sus animales y responder algunas preguntas sobre el manejo de los mismos que es de interés para conocer qué puede estar ayudando a la presentación de la enfermedad en su finca.
- Permitirnos tomar una muestra de sangre de 5 CC y una muestra de materia fecal a algunas ovejas y vacas de su finca. Además recogeremos caracoles de diferentes sitios de su predio.

La toma de muestras de sangre se realizará de manera idónea por profesionales especializados sin que implique ningún tipo de riesgo biológico o traumático y se hará con las debidas condiciones de asepsia (higiene) utilizando materiales de alta calidad y las normas pertinentes de Bioseguridad que se requieren.

Haremos campañas educativas a las comunidades del estudio para explicarles los resultados que encontramos y entre todos buscarle salidas al problema.

Su participación es voluntaria y podrá retirarse cuando lo estime conveniente, no existirá ningún tipo de retribución o reconocimiento de cualquier índole. Los beneficios del estudio estarán dados por el conocimiento de la enfermedad y las posibles alternativas de control al mismo.

Los resultados obtenidos son totalmente confidenciales y los conocerá en primera instancia el sujeto del estudio.

Agradecemos su participación en el proyecto y le solicitamos su autorización para que las muestras tomadas puedan ser utilizadas si se requieren en otros estudios clínicos futuros que sirvan al conocimiento y mejoramiento de la salud animal y humana de los implicados en la investigación.

El responsable de la investigación es el profesor Nelson Uribe Delgado de la Universidad Industrial de Santander, acompañado por un equipo de varias Universidades, muy humano y científicamente calificado para desarrollar el proyecto. Cualquier inquietud acerca del desarrollo del proyecto puede ser consultada a las personas del equipo y si lo considera necesario comunicarse con el investigador responsable puede hacerlo al teléfono 3204456726 o al teléfono 6344000 Ext. 3145 con la profesora Myriam Orostegui.

Nombre y apellidos del participante:

Firma del participante:

Fecha: _____

Certifico que yo o algún miembro del grupo de investigación le ha explicado a la persona cuyo nombre aparece registrado en este formulario, sobre esta investigación y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados a su participación así como las respuestas a las preguntas e inquietudes que planteen los participantes.

Nombre del investigador y/o encuestador:

Firma del investigador:

_____ Fecha: _____

Anexo B. Consentimiento Informado (Toma de Muestras Humanos)

Con base en los principios establecidos en la Resolución 008430 de 4 de octubre de 1993 por la cual se establecen las normas para la investigación en salud, específicamente en el artículo 15, en lo relacionado con el Consentimiento Informado, usted deberá conocer acerca de esta investigación y aceptar participar en ella si lo considera conveniente. Por favor lea con cuidado y haga las preguntas que desee hasta su total comprensión.

La Fasciolosis es causada por un gusano llamado *Fasciola hepática*, conocida también con el nombre de Mariposa. Es una enfermedad que afecta principalmente al ganado ovino y vacuno causando graves pérdidas económicas; pero también es una enfermedad que afecta a las personas.

Con este proyecto buscamos conocer si algún miembro de su familia sufre o ha sufrido la infección y conocer las posibles causas que han llevado a ello y a buscar conjuntamente alternativas de solución al problema.

Su participación consistirá en lo siguiente:

- Responder algunas preguntas sobre la salud de los miembros de la familia y sus hábitos de alimentación.
- Permitirnos tomar una muestra de sangre de 5 CC y una de materia fecal.

La toma de muestras de sangre se realizará de manera idónea por profesionales especializados sin que implique ningún tipo de riesgo biológico o traumático y se hará con las debidas condiciones de asepsia (higiene) utilizando materiales de alta calidad y las normas pertinentes de bioseguridad que se requieren.

Haremos campañas educativas a las comunidades del estudio para explicarles los resultados que encontramos y entre todos buscarle salidas al problema.

Su participación es voluntaria y podrá retirarse cuando lo estime conveniente, no existirá ningún tipo de retribución o reconocimiento de cualquier índole.

Los resultados obtenidos son totalmente confidenciales y los conocerá en primera instancia el sujeto del estudio.

Agradecemos su participación en el proyecto y le solicitamos su autorización para que las muestras tomadas puedan ser utilizadas si se requieren en otros estudios clínicos futuros que sirvan al conocimiento y mejoramiento de la salud animal y humana de los implicados en la investigación.

El responsable de la investigación es el profesor de la Universidad Industrial de Santander Nelson Uribe Delgado, acompañado por un equipo de varias Universidades, muy humano y científicamente calificado para desarrollar el proyecto. Cualquier inquietud acerca del desarrollo del proyecto puede ser consultada a las personas del equipo y si lo considera necesario comunicarse con el investigador responsable puede hacerlo al teléfono 3204456726 o al teléfono 6344000 Ext. 3145 con la profesora Myriam Orostegui.

Nombre y apellidos del participante:

Firma del participante:

_____ Fecha: _____

Certifico que yo o algún miembro del grupo de investigación le ha explicado a la persona cuyo nombre aparece registrado en este formulario, sobre esta investigación y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados a su participación así como las respuestas a las preguntas e inquietudes que planteen los participantes.

Nombre del investigador y/o encuestador: _____

Firma del investigador: _____ Fecha: _____

Anexo C. Protocolo para la Toma de Muestra Sanguínea en Bovinos y Ovinos

Materiales

- Algodón
- Gasa
- Solución yodada
- Alcohol
- Agujas
- Jeringas
- Vacutainer
- Camisas
- Tubos secos
- Bolsas rojas para descartar material contaminado.
- Guardián
- Lazos
- Agua
- Guantes

La posición adecuada y sujeción efectiva del animal son esenciales para un muestreo con éxito; un tiempo adicional para ganar confianza del animal es generalmente de gran utilidad.

Minimizar manejo físico humano o la manipulación, ya que un animal asustado, dificulta la toma de la muestra y puede resultar en especímenes alternados.

Se sujetará al animal de tal forma que quede con sus patas dobladas por debajo del vientre, atando patas y el lomo al mismo tiempo. Un auxiliar se adosa sobre el lomo del animal y con una mano toma una oreja con la que cubre su ojo en el momento de introducir la aguja y ayuda a inmovilizar.

El sitio de punción se limpia con jabón o solución yodada dos veces y antes de la punción y después se realizará limpieza con alcohol. El procedimiento se realiza en sentido contrario al crecimiento del pelo del animal y en forma circular del centro hacia la periferia. Después de la punción el sitio se deja seco, limpio y libre de sangre ya que cualquier humedad o materia orgánica se favorecen las infecciones.

La muestras de sangre venosa en bovinos, se obtiene de las venas yugular, la cual se detecta mejor presionando con los dedos el canal yugular o usando un cordón. El vaso prominente se ve bien en la mayoría de las vacas lecheras y se palpa fácilmente en los animales obesos. Tiene aproximadamente 2 cm de diámetro. Se introduce en la vena una aguja larga calibre 14 y de 5 cm de longitud, o calibre 16 y 10 cm de longitud.

Luego de haberse introducido la aguja se hace un poco de succión con la jeringa, si ésta entro en el vaso la sangre aparecerá en la jeringa. Puede ocurrir que la aguja atraviese la vena y que la punta quede fuera del vaso, entonces, retirando la aguja lentamente se llevará la punta dentro de la luz de éste. Extraída la sangre, se quita la presión sobre la vena y se aplica presión manual sobre la punción antes de sacar la aguja y por 30 a 60 s. después para parar el sangrado.

La vena mamaria se punciona en forma semejante, cuidando el operador de ser pateado. También es más difícil de limpiar la piel, pero es innecesario destacar la vena en la mayoría de los casos.

La vena caudal se encuentra muy cerca de la arteria, para realizar la punción se alza la cola y se introduce una aguja pequeña calibre 20 ó 22 de 25mm y a 15 cm de la base de la cola verticalmente en la línea media hasta que penetre en el

bazo. Se debe identificar la sangre como venosa o arterial; ésta es más roja y sale con mayor presión.

La muestra debe separarse según el caso en plasma o suero, rotularse correctamente, analizarse inmediatamente o conservarse adecuadamente refrigerada a 4 °C, para el posterior análisis.

Anexo C.1. Protocolo para la Toma de Muestra Coprológica en Bovinos y Ovinos

COPROLÓGICOS

- Con guante o funda plástica se estimula mediante masajes el esfínter anal del animal, introducir la mano en el recto.
- Cuando se haya obtenido la cantidad suficiente de materia fecal de 20 a 40 gramos, el guante es reversado hacia adentro.
- Si la muestra tardara más de 2 horas en llegar al laboratorio, se debe pasar una parte de la muestra a un recipiente con unas gotas de formalina al 10%, y otra cantidad de muestra a un recipiente sin formalina, especialmente cuando se buscan parásitos pulmonares (identificación de larvas) y coccidias.
- Si la muestra puede llegar al laboratorio en menos de 2 horas, cerrar el guante o la funda, para la movilización.
- Identificar y enviar la muestra refrigerada.

Anexo C.2. Protocolo Toma de Muestra Sanguínea para Personas Residentes en las Fincas Muestreadas

Materiales:

- Agujas
- Tubo vacutainer tapa amarilla
- Adaptador para tubos vacutainer: Se utilizan para tubos al vacío.(Camisas)
- Torniquete: Recomendable de 2 tamaños para adultos y niños.
- Alcohol: Etilico o Isopropílico al 70%.
- Algodón
- Gasa
- Guantes
- Curita o venda adhesiva

Protocolo:

1. Cuidado y recomendaciones.

- Realizar lavado de manos.
- Mantener técnica aséptica durante todo el procedimiento.
- Utilizar campo estéril para evitar tener contacto con áreas circundantes que ofrezca el riesgo de contaminación.
- Realizar antisepsia de la zona a puncionar; no palpe la vena sin guantes una vez preparada la piel.
- Utilizar otros guantes estériles para cada punción.

2. Técnica de recolección.

- Preparación del paciente
- Identificación del paciente
- Procedimiento de la flebotomía: La muestra debe tomarse correctamente y bajo las condiciones más favorables para evitar errores. Esto incluye la absoluta identificación del paciente, el sitio a puncionar y el volumen a colectar. El paciente debe estar en posición cómoda, de preferencia en una silla especial para venopunción con descanso para los brazos.
- Seleccionar el sitio a puncionar: Al proceder a seleccionar el sitio a puncionar, evite áreas con hematoma, fístulas, quemaduras, escoriaciones de la piel o cicatrices.
- Una vez que se ha decidido por la vena a puncionar, se debe proceder a descontaminar el área con alcohol etílico o isopropílico al 70% utilizando algodón y con movimientos circulares del interior al exterior. Debe tener presente que una vez realizada la descontaminación, no debe volver a tocar el área venosa.
- Punción venosa: Ahora está preparado para realizar la extracción sanguínea. El brazo debe estar preferiblemente en posición cómoda horizontalmente. Con el torniquete en posición, haga que el paciente cierre y abra el puño de 3 a 5 veces para obtener mejor la sangre, y luego que mantenga el puño cerrado.

Si se trata de un niño, es recomendable colocar 2 dedos de la mano, debajo del codo del paciente, para evitar que doble el brazo durante la extracción.

1. Coloque la punta de la aguja en un ángulo de 15 a 30 grados sobre la superficie de la vena escogida y atravesese la piel con un movimiento firme y seguro, hasta el lumen de la vena.

2. Una vez introducida la aguja mantener firme la camisa y colocar el tubo vacutainer tapa amarilla. Evite presionar fuertemente la aguja durante la extracción.
3. Afloje el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de colectar, sin apretar el área de la punción con el algodón
4. Presione el algodón sobre el sitio de la punción aplicando una presión adecuada y no excesiva para evitar la formación de hematoma.
5. Descarte la aguja en un contenedor apropiado
6. Colocar una curita o venda en el sitio de la punción.

La sangre debe conservarse refrigerada a 4°C y llegar al laboratorio en las 24 h posteriores a la recogida. Nunca debe congelarse.

La muestra debe separarse según el caso en plasma o suero, rotularse correctamente, analizarse inmediatamente o conservarse adecuadamente refrigerada a 4 °C, o congelarse para el posterior análisis.

Anexo D. Informe de Resultados.

**INFORME DE RESULTADOS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**



**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES
TROPICALES (CINTROP)
LÍNEA TREMÁTODOS Y MALACOLOGÍA MÉDICA**

NOMBRE:

DIRECCIÓN:

MUNICIPIO:

EXÁMEN REALIZADO: serología (anticuerpos contra *Fasciola hepatica*)

FECHA:

RAUL F. SIERRA BALCARCEL

Bacteriólogo UIS

1098632851

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES TROPICALES (CINTROP)
LÍNEA TREMÁTODOS Y MALACOLOGÍA MÉDICA**



NOMBRE:

DIRECCIÓN:

MUNICIPIO:

EXÁMEN REALIZADO: Coprológico

FECHA:

INFORME DE RESULTADOS

Examen macroscópico:

- Color:

- Consistencia:

- Presencia de sangre:

- Presencia de moco:

Examen microscópico:

RAUL F. SIERRA BALCARCEL

Bacteriólogo UIS

1098632851

Anexo E. Preparación de Reactivos

10X PBS (0.1M PBS, pH 7.4):

Na₂HPO₄ (anhydrous) ----- 10.9 g
NaH₂PO₄ (anhydrous) ----- 3.2 g
NaCl ----- 90 g
Distilled water ----- 1000 ml

Mezclar para disolver y ajustar el pH a 7.4

Mantener la solución a temperatura ambiente. Diluida 1:10 con agua destilada y antes de usar, verificar el pH si es necesario.

20X PBS (0.2M PBS, pH 7.4):

Na₂HPO₄ (anhydrous) ----- 21.8 g
NaH₂PO₄ (anhydrous) ----- 6.4 g
NaCl ----- 180 g
Distilled water ----- 1000 ml

Mezclar para disolver y ajustar el pH a 7.4

Mantener la solución a temperatura ambiente. Diluida 1:20 con agua destilada y antes de usar, verificar el pH si es necesario.

10X PBS-Tween 20 (0.1M PBS, 0.5% Tween 20, pH 7.4):

Na₂HPO₄ (anhydrous) ----- 10.9 g

NaH_2PO_4 (anhydrous) ----- 3.2 g
 NaCl ----- 90 g
 Distilled water ----- 1000 ml

Mezclar para disolver y ajustar el pH a 7.4 y adicionar 5 ml de Tween 20

Mantener la solución a temperatura ambiente. Diluida 1:10 con agua destilada y antes de usar, verificar el pH si es necesario.

20X PBS-Tween 20 (0.2M PBS, 1% Tween 20, pH 7.4):

Na_2HPO_4 (anhydrous) ----- 21.8 g
 NaH_2PO_4 (anhydrous) ----- 6.4 g
 NaCl ----- 180 g
 Distilled water ----- 1000 ml

Mezclar para disolver y ajustar el pH a 7.4 y adicionar 10 ml de Tween 20

Mantener la solución a temperatura ambiente. Diluida 1:20 con agua destilada y antes de usar, verificar el pH si es necesario.

Uno de la composición común de PBS

Sal	Concentración	Concentración
(-)	(Mmol / L)	(G / L)
NaCl	137	8.00
KCl	2,7	0.20
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	1.44
KH_2PO_4	1.76	0.24
pH	7.4	7.4

Preparación 0.1M Buffer Citratado:

1. Adicionar aproximadamente 50 mL de agua destilada a una recipiente de 100ml
2. Adicionar y disolver 1.4705 g de citrato de sodio.
3. Con el acido cítrico, ajustar el pH de la solución en 4.5

Buffer fosfato (PBS) 0.01 M pH 7.2

Na₂HP0₄12 H₂O 2,60 g

Na Na₂P0₄ H₂O0,38 g

NaCl.....8,38 g

Completar el agua a.....1000,00 mL

Para hacer PMSF 100 mM que es igual a 17,4 mg / ml.

Disolver 1.74g PMSF (MW 174) en isopropanal

Añadir a un total de 100 ml (de isopropanal)

Alícuota PMSF solución

Almacenamiento de PMSF: Almacenar a -20 ° C para el almacenamiento a largo plazo, o a corto plazo a temperatura ambiente.

Medio RPMI 1640:

Llamado así por el lugar en el que se desarrolló, el Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640 es una modificación de McCoy 5A que contiene un mayor nivel de inositol. Ejemplos de tipos de células para las que este medio es apropiado, como el mieloma de mamífero y células de hibridoma, tales como hibridomas de ratón, los leucocitos humanos, y los linfocitos B y T. RPMI 1640 también se utiliza para cultivos en suspensión o células leucémicas humanas monocapa. Esta formulación se produce con L-glutamina.

Anexo F. Protocolo de Obtención de Antígeno Excretor/Secretor (E/S) de *Fasciola hepática*

En el ambiente investigativo existen diferentes formas de hacer la obtención del Ag excretor-secretor, las diferencias que existen se encaminan al planteamiento de formas más sencillas y rápidas pero con los mismo resultados, las variaciones de los pasos hará depender, en gran parte, la sensibilidad y la especificidad de las pruebas a realizar.

- Se extraen parásitos adultos de *F. hepática* de los conductos biliares de bovinos infectados.
- Se lavan muy bien en solución salina estéril.
- Se coloca 1 mL de medio RPMI + penicilina-estreptomicina (100U ml⁻¹ +10 µgml⁻¹) por cada vermes en placas de cultivo de células.
- Se incuba en ambiente de CO₂ a 37°C por 6 horas, luego se sustituye por medio nuevo dejando 18 horas más haciendo recambio cada 6 horas.
- Una vez retirados los vermes, se añade una mezcla de inhibidores de proteasas fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y EDTA, 2 mM y 1mM respectivamente.
- El medio en el que se mantuvieron vivos los vermes se centrifuga a -4°C, a 3.376 g por 30 minutos.
- El sobrenadante obtenido se congela a -70°C
- Se liofiliza por 10 horas continuas.
- Se re-suspende con PBS 0,15 M
- Se determina la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford
- Una cantidad del preparado obtenido se somete a un proceso de filtración por centrifugación con membrana Amicon con poro de 50 y 100 kDa.
- Se centrifuga a 5.000 g por 30 min.

- Otra porción del preparado se concentra y purifica por el método de TCA (ácido tricloro-acético), método sencillo y económico, con el objetivo de comparar las diferentes preparaciones.
- Se determina la concentración de proteínas de todos los preparados obtenidos, usando el método de Bradford
- se congela la fracción obtenida a -70°C hasta su uso.

MATERIALES:

- Adultos de *Fasciola hepatica* (100).
- Placa de cultivo celular
- Incubadora de CO₂.
- Centrifuga de temperatura
- Freezer
- Bradford
- Reactivo de Bradford
- PBS
- Albúmina bovina.
- Fracciones de proteína.
- Espectrofotómetro.
- Tubos de espectrofotómetro.
- Membrana Amicon con poro de 50 y 100 KDa
- Centrifuga normal
- Erlenmeyer de 200 ml
- Pipetas de vidrio (5, 10, 20, 50 ml)

REACTIVOS:

- Solución salina estéril

- Medio de cultivo RPMI
- Penicilina – estreptomicina
- Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) - 2 mM
- EDTA - 1 mM
- PBS 0.15M

Uso para el ELISA

La solución del antígeno E/S Fh debe estar a una concentración de 1.5 µg/µl para su uso, en caso de disolverse la alícuota debe realizarse en buffer 0.1M carbonate coating pH 9.6.

Anexo G. Método de Bradford Fundamento

Al unirse a la proteína, este reactivo, sufre un cambio en su máximo de absorbancia, esta nueva conformación es la que se mide con el espectrofotómetro y es proporcional, por tanto, a la cantidad de proteína. Así, cuánto más proteína halla en la disolución más cambio en la absorbancia habrá, es decir, más absorción habrá en el nuevo máximo que es 595 nm. El cambio que se evidencia corresponde de 465 a 595 nm.

La unión colorante-proteína es un proceso que ocurre muy rápido, aproximadamente en 2 minutos y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, una hora. Haciendo de este un proceso rápido, y que no requiere un tiempo crítico para el ensayo.

Las interferencias no existen o son mínimas por cationes tanto sodio como potasio y carbohidratos como la sacarosa. Otras sustancias que interfieren en el ensayo son agentes fuertemente alcalinos (cuestión fácilmente reversible con la utilización de tampones). Los únicos componentes encontrados que dan una excesiva interferencia en el color del ensayo, son grandes cantidades de detergentes como el SDS, Triton X-100, etc.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD

REFERENCIA: BRADFORD, M.M.; "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976).

A) Reactivos:

Reactivo de Bradford,

- i. Disolver 5 mg de azul de Comassie en 2.5 ml de Etanol al 96 %.
 - ii. Añadir 5 ml de ác. ortofosfórico 85 %.
 - iii. Diluir hasta 50 ml con H₂O destilada.
 - iv. Dejar reposar 24 h en oscuridad y filtrar dos veces con papel de filtro o con filtros de 45 nm.
- **iii conservar en botella oscura no más de 15 días !!!!**

Patrón de BSA, 100 µg/ml en H₂O.

B) TÉCNICA

	B	P1	P2	P4	P6	P8	P10	Pr1	Pr2
H ₂ O	100 µl	90 µl	80 µl	60 µl	40 µl	20 µl	—	—	—
Patrón	—	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl	—	—
Problema	—	—	—	—	—	—	—	25 µl	50 µl
Reac. Bradford	←————— 1000 µl —————→								
	AGITAR BIEN, Esperar 2-3 min								
	Leer ABS a 595 nm								

La reacción es estable durante 1 h.

Lavar la cubeta con metanol entre medida y medida.

Anexo H.

TCA protein precipitation protocol

(originally from Luis Sanchez)

revised: October 10, 2001

author: clw

Stock Solutions: 100% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA)
recipe: dissolve 500g TCA (as shipped) into 350 ml dH₂O, store at RT.
(for details, check Maniatis under TCA ppt)

Precipitation Protocol:

1. Add 1 volume of TCA stock to 4 volumes of protein sample.
i.e. in 1.5ml tube with maximum vol., add 250µl TCA to 1.0ml sample.
2. Incubate 10 min at 4°C.
3. Spin tube in microcentrifuge at 14K rpm, 5 min.
4. Remove supernatant, leaving protein pellet intact. Pellet should be formed from whitish, fluffy ppt.
5. Wash pellet with 200µl cold acetone.
6. Spin tube in microfuge at 14K rpm, 5min.
7. Repeat steps 4-6 for a total of 2 acetone washes.
8. Dry pellet by placing tube in 95°C heat block for 5-10 min to drive off acetone.
9. For SDS-PAGE, add 2X or 4X sample buffer (with or without βME) and boil sample for 10 min in 95°C heat block before loading sample onto polyacrylamide gel.

Anexo I. Estandarización de la Técnica de Elisa para Fasciolosis Animal (Bovina y Ovina)

Técnica>

1. Se determina la concentración del antígeno a utilizar (todos los antígenos obtenidos), mediante el método de Bradford, debe superar los 0.8 µg/µl
2. Se tapiza cada pozo de la placa (Greiner bio-one fondo en U, Apogent fondo plano) con 100 µl de antígeno E/S Fh a concentraciones de **1, 1.5, 2.5 y 5 ug/mL**, con buffer carbonato- bicarbonato (10 mL de preparado de cada concentración son necesarios para una placa entera), esto con el fin de comparar los resultados frente a las diferentes medidas; se dejan sensibilizar durante 18 horas a 4°C
3. Las placas se lavan con PBS-tween 20 al 0.05% 3 veces manualmente 2 min/cu.
4. Se adiciona el bloqueador preparado con solución de lavado y se deja 1 hora en incubación a 37°C (leche descremada al 1, 5%, gelatina sin sabor al 0.2, 0.5% y leche de soja al 1, 5%) esto con el fin de comparar los resultados frente a las diferentes opciones.
5. Se realiza un lavado rápido de las placas con la solución de lavado descrita.
6. Las placas pueden guardarse en nevera a 4°C hasta su uso.
7. Se prepara un blanco, (solución bloqueadora junto con todos los reactivos que se adicionan igual que los demás) y se dispone según el esquema planteado con anterioridad.
8. Se adicionan los sueros problema (negativos, positivos y de reacción cruzada) con diluciones específicas para cada especie (**1/200, 1/500 y 1/800**) con el bloqueador seleccionado intentando cruzar todas las posibilidades, se incuba 1 hora a 37°C.
9. Se realizan 3 lavados rápidos y luego 3 lavados lentos de 2 min/cu.

10. Se adicionan 100 μ L/pozo de anti IgG bovina/ovina conjugada con peroxidasa en diluciones de **1/20.000**, **1/30.000**, **1/50.000** en solución bloqueadora (el inserto recomienda su uso en dilución de 1:30.000 por lo que se prueban cifras inferiores y superiores); se incuba 1 hora a 37°C.
11. Se realizan 3 lavados rápidos y 3 lavados lentos de 2 min/cu.
12. Se adiciona 100 μ L por pozo de solución substrato que consta de tampón citrato 0.1M pH 5 10 mL, peroxidasa hidrogenada 10uL, o-phenylenediaminehydrochloride 10 mg, probando también concentraciones de 2, 5 y 20 mg/placa (se incuba aproximadamente 8 minutos en oscuridad a 21 °C).
13. La reacción se detiene con 50 μ L/pozo de ácido sulfúrico 2N
14. Las placa se lee en el lector de ELISA a 490 nm
15. Se tomaron 80 sueros negativos, 80 sueros positivos, y 43 sueros de reacción cruzada en total para realizar todas las pruebas y cruces necesarios.

A cada pozo se le resta el valor desarrollado por el blanco.

Anexo J. Estandarización de la Técnica de Elisa para Fasciolosis Humana.

Técnica>

1. Se determina la concentración del antígeno a utilizar (todos los antígenos obtenidos), mediante el método de Bradford, debe superar los 0.8 µg/µl
2. Se tapiza cada pozo de la placa (Greiner bio-one fondo en U, Apogent fondo plano) con 100 µl de antígeno E/S Fh a concentraciones de **1, 1.5, 2.5 y 5 ug/mL**, con buffer carbonato- bicarbonato (10 mL de preparado de cada concentración son necesarios para una placa entera), esto con el fin de comparar los resultados frente a las diferentes medidas; se dejan sensibilizar durante 18 horas a 4°C
3. Las placas se lavan con PBS-tween 20 al 0.05% 3 veces manualmente 2 min/cu.
4. Se adiciona el bloqueador preparado con solución de lavado y se deja 1 hora en incubación a 37°C (leche descremada al 1, 5%, gelatina sin sabor al 0.2, 0.5% y leche de soja al 1, 5%) esto con el fin de comparar los resultados frente a las diferentes opciones.
5. Se realiza un lavado rápido de las placas con la solución de lavado descrita.
6. Las placas pueden guardarse en nevera a 4°C hasta su uso.
7. Se prepara un blanco, (solución bloqueadora junto con todos los reactivos que se adicionan igual que los demás) y se dispone según el esquema planteado con anterioridad.
8. Se adicionan los sueros problema (negativos, positivos y de reacción cruzada) con diluciones específicas de la especie (**1/100, 1/200 y 1/500**) con el bloqueador seleccionado intentando cruzar todas las posibilidades, se incuba 1 hora a 37°C.
9. Se realizan 3 lavados rápidos y luego 3 lavados lentos de 2 min/cu.
10. Se adicionan 100 µL/pozo de anti IgG humana conjugada con peroxidasa en diluciones de **1/20.000, 1/30.000, 1/50.000** en solución bloqueadora (el inserto

recomienda su uso en dilución de 1:30.000 por lo que se prueban cifras inferiores y superiores); se incuba 1 hora a 37°C.

11. Se realizan 3 lavados rápidos y 3 lavados lentos de 2 min/cu.
12. Se adiciona 100 µL por pozo de solución substrato que consta de tampón citrato 0.1 M pH 5 10 mL, peroxidasa hidrogenada 10uL, o-phenylenediaminehydrochloride 10 mg, probando también concentraciones de 2, 5 y 20 mg/placa (se incuba aproximadamente 8 minutos en oscuridad a 21 °C).
13. La reacción se detiene con 50 µL/pozo de ácido sulfúrico 2N
14. Las placa se lee en el lector de ELISA a 490 nm
15. Se tomaron 40 sueros negativos, 6 sueros positivos, y 15 sueros de reacción cruzada en total para realizar todas las pruebas y cruces necesarios.

A cada pozo se le resta el valor desarrollado por el blanco.