

Posibilidades del dot-ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis bovina*

Castro, E.**; Freyre, A.**; Falcón, D.**; Molinari, C.**

RESUMEN

Se evaluó la técnica de dot-ELISA para la detección de anticuerpos contra *Fasciola hepatica* en 57 sueros de vacas y novillos raza Hereford, de frigorífico, empleando como antígeno los productos de secreción/excreción del parásito adulto.

Veinte vacunos que presentaban sólo ejemplares adultos de *F. hepatica* y sin lesión hepática presentaron títulos *Moniezia* entre 1:32 y 1:256. Quince bovinos sin *F. hepatica*, quiste hidático, *Paramphistomum*, nódulos de *Oesophagostomum*, ni nematodos gastrointestinales reaccionaron negativamente, al igual que 5 bovinos infestados sólo con *Paramphistomum* y 5 bovinos que presentaban larvas enquistadas de *Oesophagostomum*. Cinco de 12 vacunos con infestaciones únicas a quiste hidático hepático, reaccionaron positivamente con el antígeno de *F. hepatica*, tal vez debido a la presencia de anticuerpos residuales contra *F. hepatica* o a epitope(s) comunes entre ambos parásitos. Se ensayaron 12 sueros de terneros con infestación de nematodos gastrointestinales adultos de *Haemonchus sp.* y *Ostertagia sp.*, 7 de los cuales reaccionaron al dot-ELISA y contra quiste hidático, no pudiéndose arrojar conclusiones válidas al respecto.

La repetibilidad del método fue buena. Sólo hubo variación de los títulos a diluciones dobles. El uso de dipsticks resultó más práctico que la utilización de discos individuales de nitrocelulosa. La reacción del dot-ELISA para *F. hepatica* en el vacuno sería de especificidad muy variable de acuerdo a las condiciones y los resultados de este estudio en particular. Esta característica es pasible de ser mejorada. Ello es deseable por tratarse de una reacción de fácil ejecución y excelente sensibilidad, que merece ser puesta a punto en el futuro.

Palabras clave: Bovinos, inmunodiagnóstico, *Fasciola hepatica*

SUMMARY

The dot-ELISA technique was evaluated for detection of *F. hepatica* antibodies in 57 Hereford cattle sera at slaughterhouse. Secretion/excretion products of adult parasites were used as antigens.

20 steers parasitized with only adult specimens of *F. hepatica* had antibody titers of 1:32 to 1:256. 15 steers free of *F. hepatica*, hydatid cyst, *Paramphistomum*, *Moniezia*, *Oesophagostomum* nodules and gastrointestinal nematodes, and 5 steers with only *Oesophagostomum* nodules, did not react in the dot-ELISA. 5 of 12 steer sera with only hydatid cyst infections reacted positive with *F. hepatica* antigen, maybe due a presence of residuals antibodies or a commonly epitope(s). It was assayed 12 sera from calves infected with gastrointestinal nematodes (*Haemonchus sp.* and *Ostertagia sp.*) and 7 reacted positivity to the dot-ELISA reaction and against hidatid cyst. It can not offer reliable conclusion.

Repeatability of the assay was good. Dipsticks were more practical than individual nitrocellulose disks.

The specificity of the dot-ELISA for *F. hepatica* in cattle was quite variable in the conditions of the present study. This characteristic can be improved, something worth trying on account that the assay can be easily performed and has excellent sensitivity.

Key words: cattle, immunodiagnosis, *Fasciola hepatica*

* Proyecto financiado por la International Foundation for Science, Estocolmo, Suecia (Proyecto B/1910-1)

** Instituto de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Avda. Alberto Lasplacas 1550. Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCION

El tradicional análisis coproparasitario para la detección de huevos de *Fasciola hepatica* adolece de algunos inconvenientes:

1) no detecta la infección durante el período prepatente

2) su sensibilidad no es muy buena y depende, además, del laboratorista

3) es una técnica tediosa y no automatizable.

Por ello, desde hace algunos años se están evaluando métodos alternativos de diagnóstico de la fascioliasis por medio de la detección de anticuerpos circulantes. Estos métodos seroinmunológicos pueden suplementar el diagnóstico coproparasitario rutinario, y ser también de utilidad en estudios epidemiológicos.

La técnica enzimática de inmunoensayo (ELISA) ha sido ampliamente usada para el diagnóstico de laboratorio de la fascioliasis natural y experimental en ovinos (12, 28) y bovinos (1,4,8,9,25). Para aumentar la sensibilidad y especificidad del test se fracciona el antígeno (11,16). En la detección de la fascioliasis ovina, se obtienen resultados alentadores al utilizarse los productos metabólicos de *F. hepatica* (2,28). La mayor sensibilidad, especificidad y precocidad de estos últimos queda demostrada al compararse su comportamiento, mediante la técnica de ELISA, con un extracto soluble de ejemplares adultos en la detección de anticuerpos específicos, durante la infestación natural de bovinos (22).

Con el fin de desarrollar una técnica inmunodiagnóstica más sencilla y económica, y aumentar la

reproducibilidad evitando así el "efecto edge" (6,5,13), se sustituyeron las microplacas por membranas de nitrocelulosa (10,17, 18). Se usaron discos aislados de nitrocelulosa y placas de membranas de nitrocelulosa descartables, estas últimas fueron más prácticas, pero de costo elevado (18).

Posteriormente se ensayó el "dipstick", fijando los discos de nitrocelulosa a tiras de plástico con una goma insoluble en agua, el cual permite testar, al mismo tiempo, un suero frente a diversos antígenos (19).

Hasta el momento, el dot-ELISA ha sido usado en parasitología veterinaria para la detección de anticuerpos contra *Babesia canis* (24), *Amblyoma americanum* en bovinos y *Dermaconter andersoni* en bovinos y conejos (26, 27), *Sarcocystis muris* (23), contra *F. hepatica* (3, 29), *Anaplasma marginale* (15), y para el diagnóstico de la leishmaniasis canina visceral*.

El objetivo del presente trabajo fue indagar, primariamente, las posibilidades diagnósticas de la técnica de dot-ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis en el vacuno.

a) Determinar la mínima dilución indicativa de infestación a *F. hepatica* en el test de dot-ELISA en vacunos.

b) Adquirir una noción acerca de los títulos habituales de anticuerpos en la infestación natural.

c) Determinar la especificidad de la reacción en presencia de quistes hidáticos, larvas enquistadas de *Oesophagostomum*, y formas adultas de *Paramphistomum*, *Ostertagia* y *Haemonchus*.

MATERIAL Y METODOS

1) Animales

Se utilizaron muestras de suero de vacas y novillos raza Hereford obtenidas en frigorífico, y de terneros raza Hereford de campo.

A) Frigorífico

Se seleccionaron 5 grupos de animales de acuerdo a la inspección y palpación de vísceras, al corte de parénquima hepático y pulmonar, y al estudio coprológico (método de Mc Master), practicándose la técnica de dot-ELISA en el suero proveniente de los siguientes vacunos:

a) sin la presencia de *F. hepatica*, quiste hidático, *Paramphistomum*, *Moniezia*, larvas enquistadas de *Oesophagostomum*, ni ejemplares adultos de nematodos gastrointestinales (15 sueros). (Controles negativos).

b) presentando únicamente *F. hepatica* en los canalículos biliares, pero sin lesión hepática macroscópica como supuesto de no infestación previa (20 sueros). (Controles positivos).

c) presentando únicamente quistes hidáticos en hígado (12 sueros).

d) presentando únicamente formas larvianas de *Oesophagostomum* (nódulos intestinales) (5 sueros).

e) presentando únicamente ejemplares adultos de *Paramphistomum* (5 sueros).

B) Campo

La presencia de parásitos gastrointestinales se debió estudiar

* Comunicación personal M. Portús.

en terneros de campo, en virtud de que la mayoría de los animales que van a faena son categorías resistentes (mayores de 4 años) o fueron dosificados previamente. Se seleccionaron 12 terneros raza Hereford de 18 meses de edad provenientes de un establecimiento sin antecedentes de infección por *F. hepatica*. Se realizó contaje de huevos según el método de Mc Master modificado, utilizando sólo aquellos sueros provenientes de animales con contajes superiores a 200 h.p.g.. Se determinó el género parasitario por coprocultivo según el método de Roberts-O'Sullivan (21).

Para confirmar la ausencia de quiste hidático se realizó la técnica de dot-ELISA usando como antígeno líquido hidático. Para descartar infecciones patentes por *Paramphistomum* se realizó sedimentación simple.

2) Antígeno

Se utilizó como antígeno los productos de secreción-excreción obtenidos de ejemplares adultos de *F. hepatica* según la técnica descrita por Dawes (7) y modificada por Arriaga et al. (3). La determinación proteica se realizó según el método de Lowry et al. (14), obteniéndose 1,37 mg de proteína por ml. La concentración óptima de antígeno se determinó confrontando soluciones a 0,53 y 0,85 mg/ml de proteína a dilución constante de conjugado (1:100) contra suero sin diluir y diluciones dobles de suero a partir de 1:2. La concentración de trabajo fue de 0,53 mg/ml de proteína.

Se utilizó un solo lote de antígeno y esta preparación se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

3) Sueros control

Como sueros control positivos, se utilizó un pool de sueros provenientes de novillos y vacas que presentaron únicamente ejemplares adultos de *F. hepatica* en la faena. Los órganos de estos animales no presentaron quiste hidático, *Paramphistomum*, *Moniezia*, larvas enquistadas de *Oesophagostomum* ni ejemplares adultos de nematodos gastrointestinales.

Como sueros control negativos, se utilizó un pool de sueros de animales que no presentaron ninguno de los parásitos anteriores en la faena.

Se hicieron alícuotas de los dos pool anteriores, las que se almacenaron a -20°C. En todas las determinaciones del test de dot-ELISA se incluyeron alícuotas de ambos pools.

4) Bloqueo. Diluciones de suero y conjugado

Como agente bloqueante se utilizó leche bovina en polvo al 5% en tampón fosfato-NaCl isotónico (pH 7,4), conteniendo 0,05% de Tween 20. La membrana se incubó a 37°C por 30 min.

Tanto las diluciones de suero como de conjugado se hicieron con tampón fosfato-NaCl isotónico (pH 7,4) conteniendo 0,05 de Tween y leche bovina en polvo al 1%. Ambos se incubaron a 37°C por 20 min.

Se utilizó un preparado comercial de antiIgG bovina obtenida en cabra, conjugada con peroxidasa (Chemicon, USA). La dilución óptima de trabajo se obtuvo enfrentando diluciones dobles de conjugado a partir de 1:50 hasta 1:1600 con una concentración antigénica constante de 0,53 mg/ml de proteína, y diluciones dobles de suero a partir de 1:2.

5) Substrato

Como substrato de la enzima se usó el 4-cloro-1-naftol (Sigma Chemie Gmgh) según Hawkes et al. (10). Se preparó una solución madre de 30 mg en 10 ml de metanol absoluto y se almacenó a 4°C hasta una semana. Antes de su uso se diluyeron 2 ml de esta solución en 8 ml de tampón fosfatos-NaCl isotónico y se le agregaron 6 microlitros de peróxido de hidrógeno al 30%. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con esta solución entre 10 y 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

6) Discos y dipsticks

Se ensayó el uso de discos de 3 mm de diámetro colocados en pocillos de placas de microtitulación. También se ensayaron "dipsticks" (19) consistentes en discos de nitrocelulosa pegados a tiras de plástico rígido en ángulo de 90°. Esta variación de la técnica de Pappas (19) se hizo con el fin de que los discos quedaran completamente sumergidos en 100 microlitros de reactivo. Una vez fijado el antígeno, algunos se usaron en el momento, y otros fueron conservados a menos 20°C por 30 días.

Para facilitar la manipulación de los "dipsticks" en la placa de microtitulación, para una secuencia de diluciones de un mismo suero, se adhirieron 12 "dipsticks" a una varilla de aluminio con cemento de contacto. Tanto para el uso de los discos de nitrocelulosa como de los "dipsticks" se utilizaron las mismas variables.

7) Procedimiento de rutina

Como procedimiento de rutina

se utilizó el protocolo para el diagnóstico de la leishmaniasis canina de Portús et al*, pero una vez depositado el antígeno, se secó la membrana a 56°C durante 15 min.

- Adsorción del antígeno a la membrana. (1)

- Bloqueo con fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%-leche bovina en polvo al 5%. Incubación a 37°C por 30 min.(100l).

- El suero se testó sin diluir y a diluciones dobles a partir de 1:2 hasta 1:512 en fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%-leche bovina en polvo al 1%. Incubación a 37° por 20 min.. (100l)

- 3 lavados de 5 min. cada uno con fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%. (200l)

- Incubación de conjugado a la dilución 1:100 en tampón, a 37° por 20 min. (100l)

- 3 lavados de 5 min. cada uno con fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%. (200l)

- Incubación de la solución sustrato en la oscuridad entre 10-15 min. (100l). La reacción se corta con agua de canilla.

Cada test incluyó los siguientes controles:

a. Control del conjugado: el antígeno fue incubado sin suero, sólo con tampón fosfato-NaCl isotónico-Tween 20 al 0,05% y leche bovina en polvo al 1% conjugado y sustrato.

b. Control del sustrato: el antígeno fue incubado sin suero y sin conjugado, sólo con tampón fosfato-NaCl isotónico-Tween 20 al 0,05% y leche bovina en polvo al 1% y sustrato.

c. Control positivo y

d) Control negativo (Ver 3) (Sueros control).

Cuadro 1

Resultados de 57 sueros vacunos ensayados por la técnica de dot-ELISA para *F. hepatica*

Playa de faena	Técnica de dot-ELISA		
	Total	Reaccionantes (+)	Reaccionantes (-)
Sin <i>F. hepatica</i> , ni otros parásitos	15	0	15
Con <i>F. hepatica</i>	20	20	0
Con quiste hidático, solamente	12	5	7
Con <i>Paramphistomum</i> , solamente	5	0	5
Con larvas enquistadas de <i>Oesophagostomum</i> , solamente	5	0	5
TOTAL	57	25	32

8) Lectura

En la lectura se visualizó una intensa mancha azul (reacción positiva), una mancha tenue (reacción sospechosa), y sin mancha (reacción negativa). Se tomó como título para el dot-ELISA la mayor dilución de suero que mostró una mancha intensa. Una diferencia del cuádruple en el título de anticuerpos se consideró que reflejaba una modificación real; una diferencia del doble no se consideró significativa.

9) Análisis estadístico

Se estudió la repetibilidad del test y su poder discriminante. Se tomaron seis muestras, 3 sueros controles positivos y 3 sueros controles negativos, con cinco lecturas cada una. Para cada grupo (seronegativos y seropositivos), se testaron las diferencias de medias (ANOVA). La asociación entre los resultados de la autopsia y los resultados del dot-ELISA, se testó con Chi cuadrado utilizando todos

los sueros.

RESULTADOS

1) Discos y dipsticks

No se observaron diferencias en el resultado de la prueba al utilizar los dos sistemas. Si bien la preparación del "dipsticks" es engorrosa, resultó más práctica durante el ensayo que la utilización de los discos aislados.

2) Resultados obtenidos con los sueros

Los resultados obtenidos con todos los sueros estudiados se exhiben en el Cuadro 1, no incluyéndose los 12 sueros de terneros infestados con nematodos gastrointestinales. Se consideran títulos indicativos de infección 1:32 y mayores. En la figura 1 se muestra la distribución de los títulos de aquellos 43 sueros que presentaron alguna reacción.

- Los sueros de bovinos que no tenían *F. hepatica* ni otras parasitosis

*Comunicación personal M. Portús.

no reaccionaron por encima de la dilución 1:8.

- Los sueros de bovinos infestados sólo con *F. hepatica* presentaron títulos de 1:32 a 1:256.

- Los sueros de bovinos infestados sólo con quiste hidático presentaron títulos de 1:2 a 1:128.

- Los sueros de bovinos que sólo presentaron formas larvianas de *Oesophagostomum*, y los que presentaron *Paramphistomum*, se comportaron de forma similar que los sueros provenientes de vacunos que no presentaron ninguna parasitosis.

- De los 12 sueros de terneros infestados por parásitos gastrointestinales adultos (*Haemonchus placei* y *Ostertagia ostertagi*), 7 de ellos presentaron títulos entre 1:8 y 1:64. Cabe destacar que estos sueros que reaccionaron positivamente y 2 de los sueros que no reaccionaron, fueron positivos a la reacción de dot-ELISA usando como antígeno líquido hidático.

3) Especificidad

La especificidad del método fue

muy variable: no existieron reacciones cruzadas frente a otro trematode (*Paramphistomum* sp.) ni frente a la presencia de larvas enquistadas de *O. radiatum*.

Ninguno de los 15 sueros de bovinos no infestados con *F. hepatica*, quiste hidático, larvas de *Oesophagostomum*, parasitosis múltiple por gastrointestinales adultos, *Paramphistomum*, *Moniezia*, reaccionaron positivamente en el dot-ELISA. Siete sueros no mostraron reacción a ninguna dilución, y sólo uno de ellos reaccionó sin diluir. Los 8 sueros restantes mostraron una coloración tenue; 1 a la dilución 1:2, 4 a 1:4 y 3 a 1:8.

Cinco de 12 animales infestados sólo con quiste hidático presentaron una reacción francamente positiva en el dot-ELISA, con títulos entre 1:32 y 1:128. Tres no reaccionaron a ninguna dilución, y otros 4 presentaron coloraciones tenues hasta la dilución 1:4 comportándose como los sueros de los bovinos que no presentaban ninguna parasitosis; pero 5 de ellos presentaron una reacción francamente positiva, 2 sueros a la dilución 1:32 otros 2 a la dilución 1:64 y 1 a la dilución 1:128.

Con respecto a los sueros bovinos que sólo presentaban *Paramphistomum*: 3 reaccionaron tenuemente, 1 de ellos reaccionó a suero sin diluir y los otros 2 a la dilución 1:8. Los 2 restantes no reaccionaron.

De los 5 sueros de bovinos que sólo presentaban larvas de *Oesophagostomum* sólo 2 reaccionaron tenuemente, 1 a la dilución 1:2 y el otro a la dilución 1:4, no reaccionando los 3 restantes.

Los resultados obtenidos de los 12 sueros de terneros que presentaban infección múltiple por parásitos gastrointestinales adultos

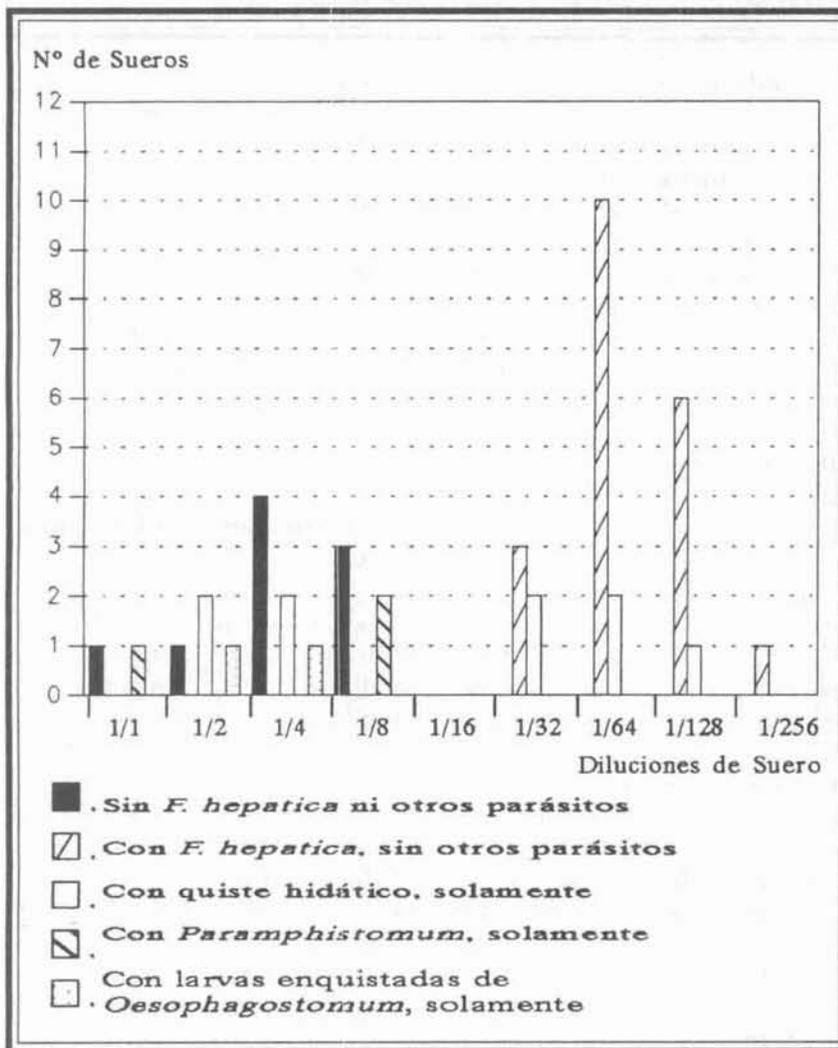


Fig. 1 Distribución de los títulos de 43 sueros vacunos que reaccionaron por la técnica de dot-ELISA para *F. hepatica*

fueron invalidados por presentar también quiste hidático.

4) Sensibilidad

Todos los sueros de bovinos infestados con *F. hepatica* reaccionaron positivamente, no ocurriendo falsos resultados negativos. Tres de ellos reaccionaron a la dilución 1:32, 10 a la dilución 1:64, 6 a la dilución 1:128 y 1 a la dilución 1:256.

5) Repetibilidad

Hubo variación de los títulos, solamente en diluciones dobles. En el cuadro 2 se expresan los resultados del estudio de 3 sueros positivos y 3 sueros negativos al test de dot-ELISA con 5 lecturas cada uno.

6) Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos fueron transformados logarítmicamente. Los resultados del estudio de ANOVA para cada uno de los grupos seropositivo y seronegativo, muestra un F de 1.165 ($p=0.0090$) y un F de 10.588 ($p=0.0027$) respectivamente. Desde el punto de vista práctico y con el objetivo de estimar la repetibilidad del método es importante centrar la atención en las varianzas residuales en ambos grupos seropositivos y seronegativos (0.1378 y 0.1376 respectivamente). Las desviaciones típicas para cada uno de ellos fue de 0.37. El intervalo de confianza a un nivel de 0.95 está dado por el antilogaritmo de 2 desviaciones típicas por debajo y por encima del valor medio de cada muestra (antilog. $(2 \times 0.37) = 2.09$), estando en este caso, entre una dilución a la mitad y una dilución al doble.

Cuadro 2

Títulos de 6 sueros ensayados 5 veces por el test de dot-ELISA

Lecturas					
Sueros +	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
1	1/64	1/32	1/32	1/32	1/64
2	1/64	1/64	1/128	1/128	1/128
3	1/128	1/64	1/64	1/128	1/64
Sueros -	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
4	1/4	1/2	1/2	1/2	1/4
5	1/4	1/4	1/4	1/8	1/8
6	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2

Los valores promedio (L_n) y las desviaciones típicas obtenidos para los resultados de los sueros positivos fueron de -4.2719 y 0.5091 respectivamente, y para los sueros negativos fueron de -0.9407 y 0.5836 respectivamente. Las lecturas para los resultados negativos son algo más dispersas que para los resultados positivos. Las medias son diferentes con un valor de $t = -16.4106$, con un nivel de significación de 1.3323×10^{-15} . Entre los valores observados como positivos y los valores observados como negativos, existe un intervalo bien definido donde no hay observaciones, lo que hace que no haya clasificaciones erradas.

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos de los sueros clasificados según los datos obtenidos de frigorífico y los resultados obtenidos según el dot-ELISA. La sensibilidad observada fue de 100% con un intervalo de confianza entre 86-100%, a nivel 95%. En virtud de que en los resultados obtenidos no se contemplaron las proporciones de las distintas enfermedades, se calcularon entonces intervalos de confianza (95) para especificidades

parciales en presencia de cada agente parasitario y en su ausencia, obteniéndose lo siguiente:

- Oesophagostomum* entre 54.9-100%
- Paramphistomum* entre 59.4-100%
- Quiste hidático entre 45.8-79.2% (promedio 58%)
- Ausencia de los distintos agentes parasitarios estudiados entre 81.9-100%

El test de Chi cuadrado para estudiar la asociación entre los resultados obtenidos en frigorífico y los resultados del test diagnóstico se realizó sobre los sueros de animales sin ninguna parasitosis, sólo con *F. hepatica*, y sólo con quiste hidático (Cuadro 1)

De acuerdo al resultado obtenido ($\chi^2=39.45$, $p<0.0001$), se acepta asociación entre ambos resultados.

DISCUSION

El formato de los "dipsticks" utilizado fue diferente al sugerido por Pappas et al. (19), con el fin de que quedaran completamente sumergidos en 100 microlitros de reactivo, puesto que sería muy

oneroso utilizar 300 microlitros de una dilución de conjugado 1/100. Sin embargo, el formato sugerido por estos autores es más resistente y tienen la ventaja de poder utilizar varios antígenos diferentes al mismo tiempo.

La reactividad de los "dipsticks" que fueron congelados se mantuvo, coincidiendo con lo comunicado por Zimmerman et al. (29) quienes almacenaron el antígeno en discos de nitrocelulosa hasta por un año. Ello permite acortar el tiempo de ejecución de la reacción en por lo menos 45 minutos.

Es posible optimizar la practicidad del método. Así, inspirados en el procedimiento de rutina de Portús et al. (*) se usará una plancha de poliestireno de 96 tubos huecos para realizar la técnica más fácilmente. Con esto se evitará el uso de discos aislados de nitrocelulosa y de "dipsticks", así como también los problemas de ruido de fondo que se presentan cuando se realizan todos los pasos con posterior filtración por vacío. De esta forma se pueden ensayar 2 diluciones de 40 sueros o titular 10 sueros, utilizándose un rectángulo de membrana de aproximadamente 8 x 10 cm. El tiempo de ejecución de la prueba se puede acortar significativamente, al conservar los rectángulos de la membrana de nitrocelulosa con el antígeno fijado y bloqueado.

De acuerdo al resultado del test de X^2 se acepta la asociación entre los resultados obtenidos de playa de faena (como criterio verdadero de clasificación) y los resultados obtenidos del dot-ELISA. La especificidad del método fue muy variable: no existieron reacciones cruzadas frente a otro trematode (*Paramphistomum* sp) ni frente a la

presencia de larvas enquistadas de *O. radiatum*. Se prefirió no dar datos porcentuales debido a la insuficiente cantidad de sueros ensayados.

Cinco de 12 animales con quiste hidático reaccionaron positivamente en el dot-ELISA pudiéndose deber a la presencia de epitope(s) comunes o a anticuerpos residuales contra *F. hepatica*. Al utilizar sueros provenientes de animales de frigorífico se desconoce si sufrieron o no infestaciones recientes tratadas o infestaciones patentes. Respecto a *O. ostertagi* y *H. placei* no se pueden arrojar conclusiones en virtud de que los sueros que reaccionaron contra *F. hepatica* también reaccionaron contra quiste hidático. De acuerdo a estos resultados se podría convalidar la hipótesis de que es posible que haya epitope(s) comunes con quiste hidático. Sin embargo, es prematuro descartar la posibilidad de epitope(s) comunes con alguno de estos parásitos gastrointestinales.

Los sueros control negativos pudieron haber presentado anticuerpos residuales de infecciones parasitarias anteriores a la faena. No obstante, con el antígeno utilizado y los títulos considerados reactivos para *F. hepatica* no se detectaron tales anticuerpos. Con ello se reafirma la validez de los sueros control negativos utilizados en el contexto del presente estudio. Las reacciones menores o iguales a 1:8 en los grupos de sueros de animales sin *F. hepatica* tal vez se deban a anticuerpos inespecíficos. Estudios anteriores que utilizaron antígeno de secreción/excreción para la detección de la fascioliasis ovina (Zimmerman et al. 1985, Arriaga et al. 1989), no se ocuparon de este problema. Sin embargo, la

sensibilidad fue muy buena ya que de los 20 sueros de animales que sólo presentaban *F. hepatica*, todos reaccionaron, y el título menor fue de 1:32.

El hecho de que el test de Bartlett haya dado homogeneidad de varianzas implica que la variación en las lecturas no se ve afectada por los títulos de anticuerpos, siendo el método igualmente preciso para muestras seropositivas como para muestras seronegativas. Por lo tanto, de acuerdo al resultado de la ANOVA, se puede decir que el método es confiable y repetible para cualquier nivel de anticuerpos. La repetibilidad del test obtenida en el presente estudio coincide con la hallada por Pappas (20) y Tenter (23).

No se pueden arrojar conclusiones válidas en cuanto a la comparación con otras técnicas de ELISA (1, 2, 4, 8, 16, 23, 26) que emplean distintas fracciones antigénicas y cantidades variables de antígeno para medir anticuerpos en animales con cargas parasitarias variables y muchas veces desconocidas. No existen, que sepamos, comunicaciones sobre el empleo del dot-ELISA para el diagnóstico de la distomatosis en el vacuno.

CONCLUSIONES

La reacción de dot-ELISA para *F. hepatica* en el vacuno, utilizando antígenos de secreción/excreción resultó de especificidad muy variable. Afortunadamente, esta característica es pasible de ser mejorada, utilizando fracciones antigénicas no comunes con *Haemonchus*, *Ostertagia* o quiste hidático, o bien absorbiendo sueros previamente con preparaciones antigénicas de estos parásitos.

La alta sensibilidad de este

*Comunicación personal M. Portús

sistema diagnóstico, su gran capacidad de automatización (un mínimo de 10 reacciones en 85 minutos), facilidad de ejecución, la no exigencia de instrumentos de laboratorio, y la necesidad de contar con un método que suplemente el tradicional análisis coproparasitario para *F. hepatica*, ameritan la puesta a punto de la técnica de dot-ELISA en el futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Ambroise-Thomas, P.; Desgeorges, P.T.; Bouttaz, M.** Le diagnostic Immunoenzymologique (ELISA) de la Fasciolose Humaine et Bovine. Detection d'anticorps et/ou d'antigenes circulants (Ann. Soc. Bel. Med. Trop.), 60:47-60, 1980.
2. **Arriaga, C.; Gómez, A.; Bautista, C. R.; Morilla, A.** Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *Fasciola hepatica* en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fascioliasis en bovinos. Téc. Pec. Mex., 44:41-51, 1983.
3. **-----, Paniagua, R.; Ruiz-Navarrete, A.; Bautista, C. and Morilla, A.** Comparison of dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA), Passive Haemagglutination Test (PHT) and Thin Layer Immunoassay (TIA) in the Diagnosis of Natural or Experimental *Fasciola hepatica* Infections in Sheep. Vet. Parasitol., 30:197-203, 1989.
4. **Burden, D. J. and Hammet, N. C.** Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepatica* in cattle. Vet. Rec., 103:158, 1978.
5. **Burt, S. M.; Carter, T. J. N.; Kricka, L. J.** Thermal characteristics of Microtiter plates used in immunological assays. J. Immuno. Method, 31:231-236, 1979.
6. **Chessum, B. S.; Denmark, J. R.** Inconstant ELISA, Lancet, 1:161, 1978.
7. **Dawes, B.** Maintenance in vitro of *Fasciola hepatica* Nature (London), 174:654-655, 1954.
8. **Farrel, C.** An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. Am. J. Vet. Res., 42 (2), 237-240, 1981.
9. **Hall, R. F.; Lang, B. Z.; Waldhalm, D. G.; Farrel, C. J.; DeLong, W.J.; Verson, D. O.** Experimentally induced *Fasciola hepatica* infection in young calves. Am. J. Vet. Res., 43 (10), 1876-1878, 1982.
10. **Hawkes, R.; Niday, E. and Gordon, J.** A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem., 119:142-147, 1982.
11. **Hillyer, G.V.** Isolation of *Fasciola hepatica* tegument antigen. J. Clin. Microbiol., 12:695-699, 1980.
12. **Jemli, M. H.; Dorchies, P. H. et Magnaval, J. I.** Application de la Technique ELISA an Diagnostic Immunologique de la fasciolose ovine: Comparision avec l'immunofluorescence indirecte et la Double diffusion en gélose. Revue Méd. Vét. 138(4), 355-359, 1987.



Distribuidora Exclusiva:



Distribuidora:

QUEIRUGA
PRODUCTOS VETERINARIOS

ARENAL GRANDE 2682 TEL.: 29 61 59
MONTEVIDEO - URUGUAY

13. **Kricka, L. J.; Carter, T. J. N.; Burt, S. M. et al.** Variability in the adsorption properties of Microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay, *Clin. Chem.*, 26:741-744, 1980.
14. **Lowry, O.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. P.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
15. **Montenegro-James, S.; Guillen, A. T.; Ma, S.-J.; Tapang, P.; Abdel-Gawad, A.; Toro, M. and Ristic, M.** Use of the dot-enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle, *J. A. V. M. A.*, 51, 10:1518-1521, 1990.
16. **Oldham, G.** Antibody response to *Fasciola hepatica* antigen during liver fluke infection of cattle. *Curr. Trop. Vet. Med. Anim. Sci.*, 22:57-71, 1982.
17. **Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, W. T.** Dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA): a microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis, *J. Immunol. Methods*, 64:205-214, 1983.
18. -----, **Hajkowski, R.; Diggs, C. and Hockmeyer, W.** Disposable nitrocellulose filtration plates simplify the Dot-ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 79, 136, 1985.
19. -----, **Rapid serodiagnosis of parasitic infection by dot-ELISA using "dipsticks".** *Trns. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80, 1006, 1986.
20. -----, **Recent applications of the dot-ELISA in immunoparasitology.** *Vet. J. parasitol.*, 29:105-129, 1988.
21. **Roberts, F. H. S.; O'Sullivan, J. P.** Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. Agric. Res.* 1,99,1950.
22. **Sinclair, I. J. and Wassal, D. A.** Serodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, 27:283-290, 1988.
23. **Tenter, A. M.** Comparison of Dot-ELISA, ELISA, and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Vet. Parasitol.*, 29:89-104, 1988.
24. **Wanduralaga, L.; Kakoma, Y.; Clabough, G. W.; Abeygunawardene, I.; Levy, M. G. and Ristic, M.** Development of dot-enzyme immunoassay for diagnosis of canine babesiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36:20-21, 1987.
25. **Wescott, R. B.; Farrel, C. J.; Shen, D. T.** Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. res.*, 45:178-179, 1984.
26. **Whelen, A. C., George, J. E.; Osburn, R. L. and Wikel, S. K.** Dot-ELISA to examine serologic responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* to ixodid tick infestation. *Fed. Proc.*, 43:1628, 1984.
27. -----, **Richardson, L. K. and Wikel, S. K.** Dot-ELISA assessment of guinea pig antibody responses to repeated *Dermacentor andersoni* infestation. *J. Parasitol.*, 72:155-162, 1986.
28. **Zimmerman, G. L.; Jen, L. W.; Cerro, J. E.; Fransworth, K. L. and Wescott, R. B.** Diagnosis of *Fasciola hepatica* in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 43:2097-2100, 1982.
29. -----, **Nelson, M. and Clark, C.** Diagnosis of ovine fascioliasis by a dot-enzyme-linked immunosorbent assay: A rapid microdiagnostic technique. *Am. J. Vet. Res.*, 46(7), 1513-1515, 1985.

Aprobado para su publicación:
4/4/95