

41



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE UN ANTIGENO SOMATICO Y UNO
METABOLICO DE Fasciola hepatica ADULTA EN EL
DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO DE LA FASCIOLASIS
EN OVINOS.

P U B L I C A C I O N
QUE . PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ALFREDO GOMEZ ARROYO

ASESOR: M. EN C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ

CUAUTITLAN, ESTADO DE MEXICO

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA

ESTA FOLIO NO SALE

DE LA BIBLIOTECA

CONFE

Autorizo a la Dirección General de Biblotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: GOMEZ ARROYO ALFREDO

FECHA: 14-NOVIEMBRE-2002

FIRMA: [Signature]

CONFE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La publicación.

"Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de
Fasciola hepatica adulta en el diagnóstico inmunológico
de la fasciolosis en ovinos".

que presenta el pasante: Alfredo Gómez Arroyo
con número de cuenta: 7211439-5 para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Octubre de 2002

PRESIDENTE	<u>MVZ. José Margarito Rojo López</u>	
VOCAL	<u>M.C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordez</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Gloria Josefina Ortiz Gasca</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. Fernando Alba Hurtado</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Gonzalo Silva Guardiola</u>	

A DIOS:
POR DARME TODO

A MIS PADRES:
POR DARME LA VIDA

A MI ESPOSA E HIJO:
CON AMOR
POR SU COMPRENSIÓN Y APOYO

A MIS HERMANAS:
POR SU EJEMPLO
Y SU APOYO INCONDICIONAL

A LOS ANIMALES:

EL MUNDO ANIMAL NO DEBE COMPARARSE CON EL DEL HOMBRE, NI SER MEDIDO EN RELACIÓN A ESTE. LOS ANIMALES SE MUEVEN EN UN ÁMBITO MAS ANTIGUO Y MAS COMPLEJO QUE EL NUESTRO; ADEMÁS ESTÁN DOTADOS DE INSTINTO QUE NOSOTROS HEMOS PERDIDOS O QUE JAMÁS POSEÍMOS, Y SE COMUNICAN POR MEDIOS QUE NUNCA COMPRENDEREMOS.

LOS ANIMALES NO SON CRIATURAS INFERIORES, NI HERMANOS NUESTROS, SON OTRAS NACIONES, OTROS ESPÍRITUS, QUE COMPARTEN CON NOSOTROS EL ESPLENDOR Y LA OSCURIDAD DE LA VIDA EN NUESTRO PLANETA.

BRIAN BARROW.

A LA U. N. A. M.

F. E. S. CUAUTITLAN:

**POR TENER EL PRIVILEGIO DE SENTIRME Y POSEER PARTE DE
ELLA.**

A MI ASESOR:

**M. EN C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
POR BRINDARME SU IMPULSO Y APOYO TOTAL, MI AMISTAD,
AGRADECIMIENTO Y RESPETO.**

CON ESPECIAL AFECTO A LOS DOCTORES:

**CAMILA ARRIAGA DE MORILLA
ANTONIO MORILLA GONZÁLEZ
CARLOS RAMÓN BAUTISTA GARFIAS**

**QUE SON PARTE FUNDAMENTAL DE ESTE TRABAJO, Y POR
BRINDARME, SU AMISTAD Y CONOCIMIENTOS GENEROSOS.**

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOLÓGICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES Y AGROPECUARIAS DE LA S. A. R. H. HOY SAGARPA.

ÍNDICE

• TITULO	Pág.
• AUTORES	203
• RESUMEN	
• INTRODUCCIÓN	
• MATERIAL Y MÉTODOS	204
Animales.	
Antígenos.	
Proteína.	
Pruebas Serológicas.	
Intradermorreacción.	
Sensibilidad.	
Especificidad.	
• RESULTADOS	205
Figura 1.	
Figura 2.	
• DISCUSIÓN	207
Figura 3.	
Tabla 1.	
Tabla 2.	
• SUMMARY	210
• LITERATURA CITADA	

EVALUACION DE UN ANTIGENO SOMATICO Y UNO METABOLICO DE *Fasciola hepatica* ADULTA EN EL DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO DE LA FASCIOLASIS EN OVINOS^{a b}

CAMILA ARRIAGA DE MORILLA^c
ALFREDO GOMEZ ARROYO^c
CARLOS RAMON BAUTISTA^d
ANTONIO MORILLA GONZALEZ^c

RESUMEN

Con el objeto de conocer cual antígeno y cual prueba son los más adecuados para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, se comparó un antígeno somático (AS) y uno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica* adulta de origen bovino. Estos antígenos se evaluaron en las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP), difusión doble en agar (DD), contra-inmunolectroforesis (CIE), inmunoensayo en capa delgada (ICD) e intradermoreacción (IDR) y se determinó la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas. Se utilizaron 30 ovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica* y 33 ovinos libres del parásito. La prueba de IDR mostró la más alta sensibilidad de 90% con AS y 93% con AM y 97% de especificidad con ambos antígenos. De las pruebas serológicas, ICD fue la de mayor sensibilidad con 80% con AS y 83% con AM, y especificidad de 97% con AS y 100% con AM. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en las diversas pruebas con AS o AM fueron muy semejantes. Se concluyó que en ovinos las pruebas de IDR e ICD son las más confiables y que es posible la utilización indistinta de cualquiera de los dos antígenos.

- a. Recibido para su publicación el 9 de Diciembre de 1987.
- b. Proyecto financiado en parte por CONACYT.
- c. Proyecto Inmunología Experimental del Cerdo. INIFAP-SARH. Carr. México-Toluca, km. 15.5 México, D.F. 05110.
- d. Proyecto Fasciolosis, km. 12.5 Carr. Cuernavaca-Cueutla, Jiutepec, Edo. de Morelos.

Téc. Pec. Méx. Vol. 26, No. 2 (1988)

INTRODUCCION

Diversas técnicas inmunológicas han sido utilizadas para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, tales como aglutinación en látex, fijación de complemento⁷, hemaglutinación pasiva^{6, 7}, difusión doble en agar^{6, 7}, inmunofluorescencia indirecta⁹ y la más reciente ELISA¹⁴ o modificaciones de ésta como dot-ELISA^{3, 15}.

En estas pruebas se han utilizado diversas preparaciones antígenas como extractos crudos^{4, 6}, fracciones purificadas⁷ o antígenos metabólicos^{3, 15}. Algunas de estas técnicas se han establecido en animales infectados en forma experimental mientras que otras se han utilizado en ovinos infectados en forma natural en el campo y los resultados en los dos casos pueden ser diferentes¹⁰ lo que dificulta concluir cuál es el antígeno y la prueba más adecuada para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

En un trabajo anterior Gómez y Col⁶, compararon dos antígenos somáticos de *Fasciola hepatica*, un extracto crudo y un extracto deslipidizado, en cuanto a su sensibilidad y especificidad en las pruebas de hemaglutinación pasiva, difusión doble, inmonoensayo en capa delgada e intradermoreacción en ovinos y encontraron que los mejores resultados se obtuvieron con las pruebas de intradermoreacción y hemaglutinación pasiva, y no se observó diferencia en el comportamiento de los antígenos somáticos.

Recién se caracterizó el antígeno metabólico o de excreciones y secreciones de *Fasciola hepatica*¹¹ y se encontró que tienen menor número de componentes antigénicos que el extracto crudo; además se ha utilizado con buenos resultados en pruebas como inmunoensayo en capa delgada o contrainmunolectroforesis en ovinos infectados en forma experimental¹⁰.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el comportamiento del antígeno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica* con el antígeno somático crudo (AS) antes utilizado, en las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP), difusión doble en agar (DD), contrainmunolectroforesis (CIE), inmunoensayo en capa delgada (ICD) e intradermoreacción (IDR), con utilización de ovinos infectados en forma natural, y determinar cuál antígeno y cuál prueba proporciona mejor sensibilidad y espe-

cificidad para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

MATERIAL Y METODOS

Animales.

Se obtuvieron muestras de heces y de sueros de 30 ovinos localizados en Tulancingo, Hgo., considerada como zona enzoótica de fasciolosis. Por medio de un examen coproparasitológico, se comprobó la presencia de huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, como testigo se utilizaron 33 ovinos provenientes de Mérida, Yuc., zona donde hasta el momento no se ha encontrado este parásito; además los animales fueron negativos en el examen coproparasitológico.

Antígenos.

Se prepararon dos tipos de antígenos a partir de fasciolas adultas obtenidas de hígados de bovino provenientes del rastro: un antígeno somático crudo (AS) y un antígeno metabólico o de excreciones y secreciones (AM). Para la preparación del AS se siguió el método ya establecido⁵. Las fasciolas liofilizadas se

molieron en un mortero y se extrajeron con cinco volúmenes de solución salina amortiguadora de fosfatos (SSA), pH 7.2, con agitación lenta por 24 h en frío. El extracto se centrifugó a 1800 g por 40 min y el sobrenadante se guardó en alícuotas a -70°C. El AM se preparó de acuerdo con la técnica descrita por Arriaga y Col¹. Las fasciolas se lavaron con SSA con Timerosal al 0.01% y después se incubaron en solución estéril de Hedon-Fleig (1 fasciola/ml) durante 18 h a 37°C; el medio se centrifugó a 1800 g por 40 min y el sobrenadante, que constituye el AM, se almacenó en la forma indicada para el AS.

Proteína. La cantidad de proteína de los antígenos se determinó por el método de Lowry y Col⁸.

Pruebas Serológicas. Para las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP), difusión doble en agar (DD), contraelectroforesis (CIE) e inmunoensayo

en capa delgada (ICD) se emplearon las técnicas antes descritas¹.

Intradermoreacción (IDR). La prueba intradérmica se realizó según Gómez y Col⁶.

La sensibilidad o capacidad para determinar cantidades bajas de anticuerpos y la especificidad o capacidad de discriminar a los animales infectados se obtuvieron con las fórmulas utilizadas antes¹:

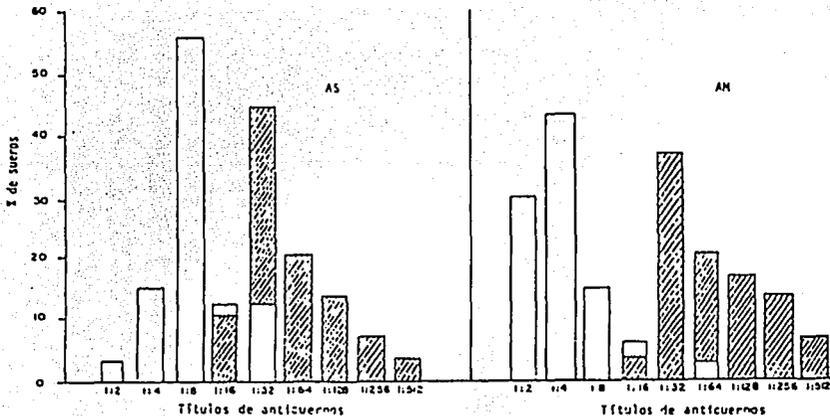
Sensibilidad = $\frac{\text{Núm. de animales con fasciolosis positivos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales con fasciolosis}} \times 100$

Especificidad = $\frac{\text{Núm. de animales sin fasciolosis negativos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales sin fasciolosis}} \times 100$

RESULTADOS

El contenido de proteína de los antígenos fue de 10/mg/ml en AS y 3 mg/ml en AM. Para estandarizar los resultados se utilizó la misma concentración de proteína en cada una de las pruebas. La Figura 1 muestra la frecuencia de títulos de anticuerpos en la prueba de HP obtenidos con los sueros de los ovinos con AS o AM. Los

Figura 1. Frecuencia de títulos de anticuerpos obtenidos en hemaglutinación pasiva con sueros de ovinos utilizando un antígeno sonáctico (AS) y un antígeno retardado (AM) de *Fasciola hepatica*.



30 ovinos de Tulancingo, Pro., zona de alta incidencia de fascioliasis.

32 ovinos de Mérida, Yuc., zona libre de fascioliasis.

animales de Tulancingo mostraron títulos entre 1:16 y 1:512 con cualquiera de los dos antígenos. Con los ovinos de Mérida se obtuvieron títulos entre 1:2 y 1:32 con el AS y entre 1:2 y 1:16 con el AM y sólo un animal dio un título de 1:64. Se consideraron positivos los sueros que dieron aglutinación hasta títulos de 1:64 o mayores.

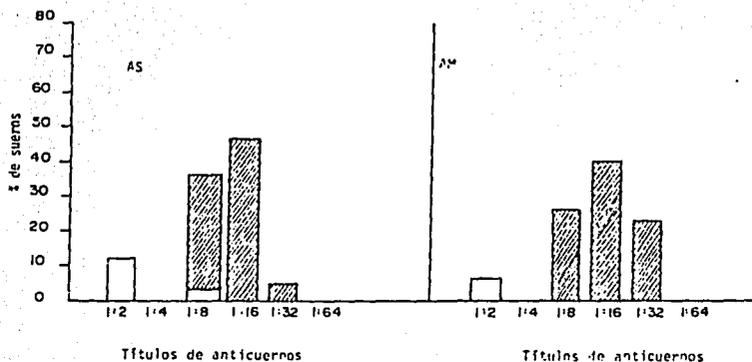
En ICD, los sueros de los ovinos de Tulancingo dieron títulos entre 1:8 y 1:32 con los dos antígenos mientras que los animales testigos en su mayoría fueron negativos y un pequeño porcentaje mostró títulos 1:2 con AS o con AM y sólo un animal dio título de 1:8 (Fig. 2). Se consideraron posi-

tivos los sueros que dieron títulos de 1:8 ó mayores.

La Figura 3 muestra los resultados de la prueba intradérmica. Los ovinos de Tulancingo mostraron un incremento máximo en el grosor de la piel a las 2 h postinoculación que en promedio fue de 7.2 mm con AS y 6.8 mm con AM. Los animales testigos mostraron un incremento en el grosor de la piel de menos de 1 mm a las 2 h después de la inoculación.

Las Tablas 1 y 2 muestran los porcentajes de animales positivos detectados por las distintas pruebas de diagnóstico y los porcentajes de sensibilidad

Figura 2. Frecuencia de títulos de anticuerpos obtenidos en inmunensayo en cadena de nata (ICD) con sueros de ovinos utilizando un antígeno somático (AS) y un antígeno metabólico (AM) de Fasciola hepática.



30 ovinos de Tulancingo, zona de alta incidencia de fascioliasis.

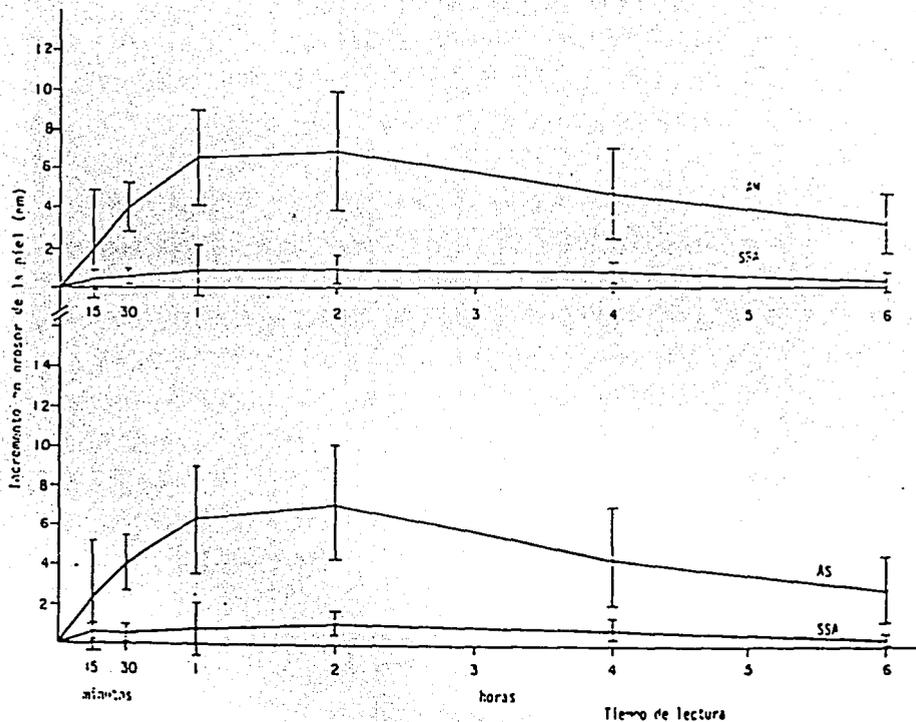
33 ovinos de Tepic, zona libre de fascioliasis.

dad y especificidad de cada una de ellas. La prueba que mostró la más alta sensibilidad fue IDR (90% con AS y 93% con AM); la especificidad fue también muy alta, 97% con ambos antígenos. De las pruebas serológicas ICD fue la que dio mayor sensibilidad (80% con AS y 83% con AM) y especificidad (97% con AS y 100% con AM). Los resultados obtenidos con los dos antígenos fueron semejantes en la mayoría de las pruebas. Sin embargo, en la prueba de HP la sensibilidad con AS fue menor (47%) que con AM (60%). También en CIE se observó menor sensibilidad con AS que con AM (57 y 73%). La sensibilidad más baja se obtuvo con DD (43% con AS y 30% con AM) aunque fue una prueba muy específica.

DISCUSION

En el establecimiento de las pruebas inmunológicas de diagnóstico es importante definir qué antígeno se va a utilizar. Los antígenos somáticos crudos de parásitos son por lo general mezclas muy complejas de distintos componentes antigénicos, mientras que los antígenos metabólicos o de excreciones y secreciones poseen un menor número de componentes, por lo que se esperaba una mayor especificidad cuando se

Figura 3. Respuesta inflamatoria de la piel de ovinos inoculados por vía intradérmica con un antígeno somático crudo (AS) y un antígeno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica* adulta y como control solución salina amortiguada (SSA).



Porcentaje de sueros de ovinos positivos a *F. hepatica*, detectados por distintas pruebas inmunológicas utilizando un antígeno somático crudo y un antígeno metabólico.

P R U E B A	Tulancingo ¹				Mérida ²	
	AS ³		AM ⁴		AS	AM
	+	+/Total	+	+/Total	+	+/Total
Hemaglutinación pasiva (HP)	47	147/30	60	187/30	3	0/33
Difusión doble en agar (DD)	43	13/30	30	9/30	3	1/33
Contrainmunolectroforesis (CIE)	57	17/30	73	22/30	22	6/27
Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	83	23/30	80	23/30	3	1/33
Intradermorreacción (IDR)	90	27/30	93	28/30	3	1/33
Coproparasitoscópico	100	30/30			0	0/33

(1) Tulancingo, Hgo., zona de alta incidencia de fascioliasis

(2) Mérida, Yuc., zona libre de fascioliasis

(3) AS: antígeno somático crudo

(4) AM: antígeno metabólico

utilizan estos últimos en las pruebas por inmunolectrotransferencia de diagnóstico. La mayor complejidad mostró que 26 de éstos del AS y 10 del AS ha sido demostrado por Rufz del AM son reconocidos por los sueros de ovinos infectados en forma experimental. En el presente trabajo, a pesar de que se utilizaron los componentes proteínicos de los dos antígenos por electroforesis en geles de poliacrilamida y encontró 48 diferencias en AS y 23 en AM; esta mayor complejidad, los valores

Tabla 2

Porcentajes de sensibilidad y especificidad de distintas pruebas inmunológicas de diagnóstico en ovinos utilizando un antígeno somático crudo y un antígeno metabólico de *Fasciola hepatica*

P R U E B A	Sensibilidad (1)		Especificidad (2)	
	AS (3)	AM (4)	AS	AM
Hemaglutinación pasiva (HP)	47	60	100	97
Difusión doble en agar (DD)	43	30	97	100
Contrainmunolectroforesis (CIE)	57	73	78	70
Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	80	83	97	100
Intradermorreacción (IDR)	90	93	97	97

(1) Sensibilidad = $\frac{\text{Núm. de animales con fascioliasis positivos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales con fascioliasis}} \times 100$

(2) Especificidad = $\frac{\text{Núm. de animales sin fascioliasis negativos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales sin fascioliasis}} \times 100$

(3) AS: antígeno somático crudo

(4) AM: antígeno metabólico

de sensibilidad y especificidad obtenidos con las diversas pruebas con AS o AM fueron muy semejantes, sólo en HP y en CIE se observó un aumento en la sensibilidad al utilizar AM. También en bovinos se ha encontrado que el comportamiento de las pruebas utilizando cualquiera de los dos antígenos es semejante¹.

De las pruebas utilizadas, IDR fue la que mostró más alta sensibilidad y especificidad lo que corrobora los resultados obtenidos por Gómez y Col⁶. Cabe anotar que en bovinos el comportamiento de IDR es diferente pues aunque la sensibilidad es alta se presentan muchos falsos positivos¹.

En cuanto a las pruebas serológicas ICD fue la que dio mejores resultados; esto concuerda con lo observado en ovinos infectados en forma experimental¹⁰ en los que es posible detectar anticuerpos contra *F. hepática* a partir de la segunda semana postinfección. Por otra parte, Gómez y Col⁶, encontraron menor sensibilidad en esta prueba al utilizar AS lo que podría explicarse por la fluctuación en los títulos de anticuerpos que ocurre en el suero de animales con fasciola^{10, 12}.

Esto mismo explicaría los resultados con HP que en el presente trabajo mostró menor sensibilidad con AS que la descrita por Gómez y Col⁶. Las fluctuaciones en los títulos de anticuerpos podrían ser debidas a la presencia de complejos inmunes circulantes, la que ha sido demostrada hace poco, en los

sueros de ovinos infectados con *F. hepática*².

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que es posible la utilización indistinta de AS o AM en las pruebas de diagnóstico y que IDR o ICD, debido a su alta sensibilidad y especificidad, son muy adecuadas para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

SUMMARY

In order to determine which antigen and which test are the most suitable for the immunological diagnosis of fasciolosis in sheep, a somatic (AS) and a metabolic (AM) antigen of adult *Fasciola hepática* were compared. These antigens were evaluated using indirect haemagglutination (IH), double immunodiffusion (DID), counterimmunoelectrophoresis (CIE), thin layer immunoassay (TIA) and intradermal test (IDT), and the sensitivity and specificity of each test was determined. For this, 30 sheep naturally infected with *Fasciola hepática* and 33 non infected sheep were used. The intradermal test showed the highest sensitivity of 90% with AS and 93% with AM, and 97% specificity with both antigens. Among the serological tests, TIA had the highest sensitivity, 80% with AS and 83% with AM, and specificity of 97% with AS and 100% with AM. The sensitivity and specificity of the different immunological tests were very similar using either AS or AM. It was concluded that either antigen could be used and that IDT and TIA were the most reliable tests in sheep.

LITERATURA CITADA

1. ARRIAGA, C., GÓMEZ, A., BAUTISTA, C.R., y MORILLA, A., 1983. Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *Fasciola hepática* en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. *Téc. Pec. Méx.* 44: 41.
2. ARRIAGA, C., RUIZ-NAVARRETE, A., GÓMEZ, A., FRAIRE, M., BAUTISTA, C.R., y MORILLA, A., 1987b. Complejos inmunes circulantes en ovinos infectados con *Fasciola hepática*. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 29: 127.

3. ARRIAGA, C., PANIAGUA, R., RUIZ-NAVARRETE, A., BAUTISTA, C.R. and MORILLA, A., 1987b. Comparison of dot enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* natural or experimental infections in sheep. Remited to *Vet. Parasitol.*
4. BENEX, J., 1964. Le diagnosticque serologique practique de la distomatose. *Bull. Soc. Path. Exotique.* 57: 495.
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL, PARASITOLOGY DIVISION, 1975. Serodiagnosis of parasitic Diseases. P. 74 U.S. Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, Georgia, U.S.A.
6. GÓMEZ, A., ARRIAGA, C., SANCHEZ, A., ESTRADA, A., MORILLA, A., 1984. Estudio comparativo de dos antígenos somáticos de *Fasciola hepatica* en el diagnóstico de fascioliasis en bovinos. *Veterinaria Méx.* 15: 193.
7. KÓRACH, S., and BENEX, J., 1966. A lipoprotein antigen in *Fasciola hepatica*. II Immunological and immunochemical properties. *Expl. Parasit.* 19: 199.
8. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
9. MOYSESIAN, M. and BOROJEVIC, F., 1973. Antigenic analysis of *Fasciola hepatica*: extraction and fractionation, In: *Isotopes and Radiation in Parasitology III*, pp: 11-12. International Atomic Energy Agency, Vienna.
10. RUIZ-NAVARRETE, A., ARRIAGA, C., GÓMEZ, A., BAUTISTA, C.R., y MORILLA A., 1985. Dinámica de la respuesta serológica de ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. *Téc. Pec. Méx.* 49: 78.
11. RUIZ-NAVARRETE, M. M.A., 1987. Análisis inmunológico de los antígenos de *Fasciola hepática*. Tesis de Maestría en Microbiología. Fac. Estudios Sup. Cuautitlán, UNAM, México.
12. VAN TIGGELE, L.J., 1978. Host-parasite relations in *Fasciola hepatica* infections. Immunopathology and diagnosis of liver fluke disease in ruminants. Ph D. Thesis. Rijksuniversiteit telaliden. The Netherlands.
13. VAN TIGGELE, L.J. and OVER, N.J., 1976. Serological diagnosis of fascioliasis. *Vet. Parasit.* 1: 239.
14. ZIMMERMAN, G.L., JEN, L.W., CERRO, J.E., FARNSWORTH, K.L., and WECOTT, R.B., 1982. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2097.
15. ZIMMERMAN, G.L., NELSON, M.J., and CLARK, C.R.B. 1985. Diagnosis of ovine fascioliasis by a dot-enzyme-linked immunosorbent assay: A rapid microdiagnostic technique. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1513.