

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**



**PREVALENCIA DE LA DISTOMATOSIS HEPÁTICA POR EL METODO DE
ELISA INDIRECTA Y DENNIS MODIFICADO EN OVINOS, EN LA
COMUNIDAD DE PFULLPURI PUENTE CCOYO USCAMARCA SANTO
TOMAS, CHUMBIVILCAS - CUSCO.**

PRESENTADO POR:

**BACHILLER, EDWIN NANO MENDOZA
CUBA.**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO.**

ASESOR:

**MVZ. EDGAR ALBERTO VALDEZ
GUTIERREZ**

CUSCO – PERU

2019

DEDICATORIA

A dios, por darme fuerza y mucha voluntad para ser perseverante en mis metas trazadas.

A mi madre Zaragoza Cuba Vera, por el apoyo incondicional y su inmenso amor; a mi padre Valentín Mendoza Merma que a pesar de nuestra distancia física siento que está conmigo siempre, aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para el como lo es para mí.

A mis hermanos Rodrigo, Redi, Mariela, Leída, Dina, Urfa; cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.

A mi enamorada que durante estos años de mi proyecto de tesis ha sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar; gracias por tu apoyo incondicional, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme ^{que} siempre podré contar contigo.

Dejando este pequeño trabajo como testimonio fiel de nuestro esfuerzo y superación constante en el camino de la vida, para el bienestar y desarrollo de nuestra familia.

AGRADECIMIENTO

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO, y muy especialmente a la FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROPECUARIA por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

- Al **MVZ. Edgar Alberto Valdez Gutierrez**, asesor del presente trabajo de investigación; por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento. Su siempre atenta y efectiva colaboración hizo que este trabajo se culminara satisfactoriamente.
- A la **ING. Fiorela K Fernandez Bustinza**, Co Asesor del presente trabajo de investigación; por haberme orientado en la culminación de la investigación.
- A todos los **DOCENTES Y PERSONAL ADMINISTRATIVO** de la FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROPECUARIA - UNSAAC - CUSCO, por su dedicación y su esfuerzo, quienes han aportado todos los conocimientos profesionales y personales para llegar a finalizar con éxito esta primera meta de mi vida profesional.
- Al Sr. Presidente; de “La Comunidad De Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca-Santo Tomas-Chumbivilcas - Cusco”; y a todo el personal de esta comunidad ganadera, por la ayuda recibida, tanto técnica como humana, en donde obtuve una rica información y la base de datos para desarrollar la parte empírica de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
ÍNDICE DE TABLAS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	XI
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	XIII
CAPITULO I	1
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	1
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	1
1.3. JUSTIFICACIÓN	1
CAPITULO II	3
MARCO TEÓRICO	3
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1.2. Detección de pruebas serológicas y coprológicas de Fasciola Hepática en ovinos	3
2.1.3. Prevalencia de la Fasciola Hepática en ovinos utilizando un método de Dennis modificado en Tacna	4
2.1.4. Prevalencia de la Distomatosis Hepática mediante un examen coproparasitologico en ovinos en Ayacucho	4
2.1.5. Prevalencia de la distomatosis hepática mediante el examen coproparasitologico en los centros poblados de Cajamarca	4
2.2. BASES TEORICAS	5
2.2.1. Distomatosis hepática	5
2.2.2. Ciclo evolutivo	9
2.2.3. Patogenia y lesiones	11
2.2.4. Acción parasitaria	14
2.2.5. Epidemiología de la enfermedad	16
2.3. INMUNOLOGÍA	20
2.3.1. Anticuerpos	20
2.3.2. Antígeno	23
2.3.3. Reacción Antígeno – Anticuerpo	24

2.4. PRUEBA DE ELISA.....	25
2.4.1. Elisa indirecta	26
2.4.2. Elisa competitivo	26
2.5. ANÁLISIS COPROPARASITOLÓGICO.....	28
2.5.1. Técnica de sedimentación	29
2.6. MÉTODO DE DENNIS MODIFICADO	29
CAPITULO III	31
MATERIALES Y MÉTODO	31
3.1. LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO	31
3.2. TRABAJO DE LABORATORIO	31
3.2.1. Ubicación política	31
3.2.2. Ubicación geográfica	32
3.3. DATOS CLIMÁTICOS	33
3.3.1. Clima	33
3.3.2. Precipitación	33
3.4. MATERIALES BIOLÓGICOS	33
3.5. MATERIALES DE CAMPO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE	34
3.6. MATERIALES Y EQUIPOS PARA LA CONSERVACIÓN DE SUERO.....	34
3.7. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	34
3.7.1. Equipos e instrumentos.....	34
3.7.2. Materiales	35
3.7.3. Reactivos.....	35
3.8. EQUIPOS DE LABORATORIO (EXAMEN COPROLÓGICO)	35
3.8.1. Materiales de campo para la recolección de heces	36
3.9. MÉTODOS DE MUESTREO.....	38
3.9.1. Población	38
3.9.2. Tipo de muestreo	38
3.9.3. Procedimiento de muestreo.....	39
3.10. MÉTODOS DE EVALUACIÓN	40
3.10.1. Metodología de campo.....	40
3.11. METODOLOGÍA EN LABORATORIO	41
3.11.1. Método Elisa indirecta	41
3.11.2. Procedimiento del método de Elisa indirecta	42

A. FLUJOGRAMA DE LA METODOLOGÍA DE ELISA INDIRECTA PARA LA FASCIOLA HEPÁTICA	44
B. DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA DE ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA DISTOMATOSIS HEPÁTICA	46
3.11.3. Interpretación de los resultados	47
3.12. MÉTODO DE DENNIS MODIFICADO	49
3.12.1. Procedimiento para realizar el hallazgo de huevos de Fasciola hepática 50	
3.13. PREVALENCIA	51
CAPITULO IV	52
RESULTADOS Y DISCUSIONES	52
4.1. Resultado de densidad óptica de muestreo de suero de ovinos	52
CAPITULO V	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
5.1. CONCLUSIONES	60
5.2. RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	68
Anexo N° 1: Calculo para determinar el tamaño de la muestra	68
Anexo N° 2: Ficha de trabajo en campo – Registro de muestra de sangre y heces	69
Anexo N° 3: Ficha de trabajo en laboratorio – Registro para la obtención de resultados de la prueba de Elisa	70
Anexo N° 4: Toma de muestra de sangre de ovinos en la comunidad Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca	71
.....	71
Anexo N° 5: Registro de ovinos para la prueba de Elisa Indirecta y Dennis Modificado	72
Anexo N° 6: Calculo para determinar la prevalencia de la Distomatosis Hepática	75
Anexo N° 7: Crioviales con suero y descongelamiento antes de ser procesados en la prueba de Elisa indirecta	75
Anexo N° 8: Resultados finales en la lectura de densidad óptica, por el método de lector de microplacas	76
Anexo N° 9: Resultados de la densidad óptica diagnóstico de la Distomatosis Hepática y del Análisis Coproparasitologico	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de antecedentes bibliograficos para Distomatosis Hepática en ovino y vacuno.	5
Tabla 2. Distribución de muestras de ovinos de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca	39
Tabla 3. Validación para valores medios de la densidad óptica (DO)	46
Tabla 4. Interpretación de resultados de la prueba de Elisa indirecta	48
Tabla 5. Lectura de Densidad Óptica (DO) proporcionada por el lector de micro placas Elisa (Chromante Manager) de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, placa n° 1.	52
Tabla 6. Lectura de Densidad Óptica (DO) proporcionada por el lector de micro placas Elisa (Chromante Manager) de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, placa n° 2.	53
Tabla 7. Lectura de Densidad Óptica (DO) proporcionada por el lector de micro placas Elisa (Chromante Manager) de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, placa n° 3.	53
Tabla 8. Clasificación de los resultados de sueros de referencia positiva y referencia negativa, analizados por Elisa Indirecta.	54
Tabla 9. Prevalencia de la Distomatosis hepática mediante la prueba de Elisa Indirecta en ovinos.....	54
Tabla 10. Prevalencia de la Distomatosis hepática mediante el método coproparasitológico en ovinos	56
Tabla 11. Prevalencia Comparativa entre los dos Métodos de Elisa Indirecta y Dennis Modificado	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de Fasciola Hepática.	11
Figura 2. Esquema de representación de Elisa Competitivo.....	27
Figura 3. Mapa de ubicación provincial (INEI, 2010)	32
Figura 4. Mapa de ubicación del distrito de Santo Tomas (INEI, 2010)	33
Figura 5. Toma de muestra de sangre entera	40
Figura 6. Toma de muestras fecales.....	41
Figura 7. Kit de Fasciola hepática a temperatura ambiente	43
Figura 8. Preparación de la solución de lavado	44
Figura 9. Dilución de muestras y controles con el diluyente de la muestra y cubra los pocillos e incube a 18 – 26 °C durante 30 minutos (\pm 2 minutos)	44
Figura 10. Incubación de la placa perfectamente sellada para evitar la evaporación a 37 °C (\pm 2 °C) durante 60 minutos (\pm 5 minutos).....	44
Figura 11. Lavado de las placas culminada la incubación de 60 minutos (\pm 5 minutos) con 300 μ l de solución de lavado por 3 veces.....	45
Figura 12. Se agregó 100 μ l de substrato TMB en cada pocillo y cubra los pocillos e incube a 18 – 26 °C durante 10 minutos (\pm 1 minuto).....	45
Figura 13. Se agregó 50 μ l de la solución frenado en cada pocillo para detener la reacción y medir la absorbancia a 450 nm.....	45
Figura 14. Muestra de heces de ovino con solución detergente y tamizando las muestras	50
Figura 15. Decantado del sobre nadante de las muestras.....	50
Figura 16. Muestra decantadas con azul de metileno, para observar en el microscopio.....	50
Figura 17. Huevos de fasciola hepática.....	58

GLOSARIO

- Ac** : Anticuerpo.
- Ag** : Antígeno.
- CMH** : Complejo mayor de histocompatibilidad.
- CD4** : Grupo de diferenciación 4.
- CD8** : Grupo de diferenciación 8.
- CDR1** : Región determinante de complementariedad 1.
- CL** : Unión constante
- Fab** : Fragmento de unión antígeno
- FC** : Fragmento cristalizante (de inmunoglobulina)
- Fc** : Receptor
- IgG** : Inmuglobulina G
- IgA** : Inmuglobulina A
- IgM** : Inmuglobulina M
- IgE** : Inmuglobulina E
- μl** : Microlitros.
- LB** : Linfocito B.
- LT** : Linfocito T.
- NCP** : Cepas no citopáticas.
- TC** : Linfocito T citotóxico.
- Th** : Linfocito T de ayuda.
- TRC** : Receptor antigénico de linfocitos T.
- VL** : Unión variable.
- VH** : Parte variable de la cadena pesada.

RESUMEN

Se ha determinado la prevalencia de la *Distomatosis hepática* en ovinos en la Comunidad de Pfullpuri puente Ccoyo Uscamarca en el distrito de Santo - Tomas, de la provincia de Chumbivilcas - Cusco, por el método inmunológico de Elisa indirecta y el método coproparasitologico de Dennis modificado, se recolectaron 94 muestras de sangre y heces de ovinos de las razas Hampshire dow, criollos, y cruzados; de las edades diferentes como madres, borreguillas, carneros. Los cuales fueron procesados en el laboratorio de Sanidad Animal "Dr. ATILIO PACHECO PACHECO" de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Zootecnia, Departamento Académico de Ganadería de la Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco. Los resultados a los que se llegaron en el presente trabajo de investigación sobre la prevalencia de la *Distomatosis hepática* mediante la prueba serológica de Elisa indirecta fue de 92.55%. este resultado se debe al alto grado de sensibilidad de la prueba; para el diagnóstico coproparasitologico de la *Distomatosis hepática* por el método de Dennis modificado de los mismos animales, se obtuvo 54 positivos y 40 negativos que representa una prevalencia de 57.45% de un total de 94 animales. Estos resultados nos indican la alta sensibilidad de la prueba de Elisa indirecta que es más precisa y una fuente confiable para realizar estudios y diagnósticos frente a los resultados hallados por el método de Dennis modificado.

INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con una población de 9,341,721 cabezas de ovinos aproximadamente, las que se distribuyen en mayor porcentaje en la región Puno, Cusco, Junín, Ancash concentran el 51% de ganado ovino. Cabe indicar el 92.5% de ovinos está en las regiones de Quechua, Suni, y Puna. El departamento del Cusco es poseedor de una población aproximada 1,208,799 de cabezas de ganado ovino, siendo una región imprescindible en la explotación ganadera (INEI, IV Censo nacional agropecuario , 2012)

Sin embargo, la eficiencia de la producción y la productividad de estas especies domesticas se ve limitado por factores que inciden negativamente, como las enfermedades parasitarias, particularmente la fasciolosis, que afecta a los animales domésticos, silvestres y al propio hombre, que muchas veces pasa por desapercibida debido a las manifestaciones clínicas, que no son muy evidentes al inicio de la enfermedad, pero al estar afectado el animal disminuye su desarrollo productivo .la importancia de esta parasitosis está referida al aspecto económico representando una pérdida de 10.5 millones de dólares americanos en el Perú. (Torrel Pajares, 1997) La diseminación de esta enfermedad parasitaria en comunidades de nuestro país se debe a que existen grandes extensiones de pastizales en condiciones especiales de humedad para el desarrollo y reproducción de los caracoles que son los hospederos intermediarios de la fasciola hepática.

Esta enfermedad ocasiona pérdidas económicas al productor a esto se suma la Zoonosis que ha adquirido caracteres alarmantes en ciertas comunidades de la sierra debido a los efectos negativos contra la salud pública y sus implicancias políticas y socioeconómicas, que afectan el bienestar y el desarrollo productivo de los animales

y por ende del productor pecuario; razón por la cual se diseña el presente estudio a fin de plantear el manejo integral de la prevención y el control de esta enfermedad a fin de mejorar la economía de los productores de ovinos de este distrito. El diagnóstico de la enfermedad se realizará mediante la prueba de Elisa indirecta que consiste en la detección de los anticuerpos serológicos usando un antígeno de secreción de la *Fasciola hepática* y una comparación de la prueba macroscópica que es la de Dennis Modificado.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La fasciolosis es una de las parasitosis más difundidas y de mucha importancia dentro de la ganadería, que produce cuantiosas pérdidas económicas; sin embargo, en algunas zonas hay un desconocimiento y despreocupación por parte de los ganaderos, no existe una dosificación adecuada de los ovinos Hampshire down, cruzados, y criollos; menos aun no se conoce la frecuencia de su presentación de la Distomatosis hepática y otros parásitos gastrointestinales motivo por el cual se realizó el presente trabajo de investigación. En la provincia de Chumbivilcas, del distrito de Santo Tomás, principalmente en la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, una de las bases importantes de la economía es la ganadería, actividad que es realizada por la población de áreas rurales como una fuente de su sustento económico, por ser una actividad de mucha importancia para las familias productoras, subsistencia familiar de impacto macro comunal, sin embargo la falta de implementación de proyectos de mejoramiento ganadero y la falta de información sobre la Distomatosis, constituyen los principales problemas que limitan los procesos productivos de los ovinos y al productor una pérdida económica. La infestación de los ovinos con la Distomatosis y otros parásitos gastrointestinales repercute notablemente en los índices de producción y reproducción, por ende, la Distomatosis está relacionada con la economía de los pobladores de las zonas rurales.

CAPITULO I

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar por el método de Elisa Indirecta y Dennis modificado el diagnóstico de la *Distomatosis Hepática* en ganado ovino de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca en el anexo de Pfullpuri – Santo Tomas - Chumbivilcas – Cusco.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de la *Distomatosis Hepática*, mediante la prueba serológica de Elisa Indirecta en ganado ovino.
- Determinar la prevalencia de la *Distomatosis Hepática*, por el método Coproparasitológico de Dennis Modificado en ganado ovino.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La comunidad de Pfullpuri puente Ccoyo Uscamarca es una de las zonas que tiene mayor poblacion ganadera medianamente mejorada con un número aproximado de 3582 cabezas de ovinos. (Agencia Agraria Santo Tomas, 2012) Donde las grandes extensiones de terrenos de pasto natural como bofedales, zonas húmedas conlleva a una alimentación extensiva de los ovinos.

La comunidad de Pfullpuri puente Ccoyo Uscamarca es una de las zonas que garantiza la población ganadera de los ovinos, siendo una actividad de mucha importancia en la producción de carne y lana, significativa para el desarrollo productivo y económico del distrito de Santo Tomás de la provincia de

Chumbivilcas, en tal sentido la enfermedad de la Fasciolosis son las causas que afecta la eficiencia reproductiva y digestiva de los ovinos en la comunidad.

Se quiere con este trabajo de investigación conocer el nivel de prevalencia de la *Distomatosis Hepática*, aportar datos actualizados y contribuir con los productores para mejorar la explotación ganadera y promover campañas de sanidad animal para mejorar la eficiencia reproductiva y alcanzar altos niveles de producción y productividad.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Detección de coproantígenos de *Fasciola* Hepática en ovinos y bovinos mediante un método de Elisa

- **Torrel Pajares (1997)** Cajamarca, el diagnóstico de Fasciolosis ovina y bovina, fue realizado mediante el análisis coproscopico e inmutoenzimático de Elisa de captura en muestras de heces de 85 ovinos y 45 bovinos beneficiados en un matadero de la ciudad de Cajamarca, Perú.

Mediante el análisis coproscopico en muestras de ovinos se obtuvo una prevalencia de la *Fasciola hepática* del 69.4% y en Elisa de captura se obtuvo una prevalencia de 90.5%.

Mediante el análisis coproscopico en muestras de vacunos se obtuvo una prevalencia de la *Fasciola hepática* del 71.1% y en Elisa de captura se obtuvo una prevalencia de 95.5%.

2.1.2. Detección de pruebas serológicas y coprológicas de *Fasciola* Hepática en ovinos

- **Casana WM (2005)** La Libertad, un estudio realizado en la Provincia de Pataz. La Libertad; entre los meses de abril y octubre del 2005. Se sometieron a pruebas serológicas y coprológicas, mediante la técnica de Western blot y Kato-Kast cualitativo; respectivamente, a 388 ovinos. Observándose que 214 ovinos (61.8%) presentaron

anticuerpos anti-Fasciola hepática y 164 (42.3%) presentaron huevos en sus heces.

2.1.3. Prevalencia de la Fasciola Hepática en ovinos utilizando un método de Dennis modificado en Tacna

- **Barriga NL. (2013)** Tacna, Otro estudio realizado en los humedales del Distrito de Ite, Provincia de Jorge Basadre –Tacna. Se determinó la prevalencia en ovinos y caprinos, utilizando en método de Dennis modificado. Se estudió 230 ovinos y 130 caprinos, resultando una prevalencia de 25.22% en ovinos y 22.31% en caprinos respectivamente.

2.1.4. Prevalencia de la Distomatosis Hepática mediante un examen coproparasitologico en ovinos en Ayacucho

- **Ticona D. (2010)** Ayacucho - distrito de Vilcashuaman, en 207 ovinos, cuyas muestras fecales fueron sometidos a la prueba coproparasitologica de sedimentación espontanea. Encontrándose una prevalencia de $39.1 \pm 4.8\%$, encontrándose significancia entre las variables zona de procedencia e infección.

2.1.5. Prevalencia de la distomatosis hepática mediante el examen coproparasitologico en los centros poblados de Cajamarca

- **Sangay M. (2013)** Cajamarca, en 384 ovinos mediante el examen Coproparasitologico. Encontrándose una prevalencia a Fasciola hepática de $29\% \pm 6,4$ para Pariamarca y una prevalencia de $27\% \pm 6,3$ para el centro poblado de Cashapampa en el distrito de Cajamarca.

Tabla 1. Resumen de antecedentes bibliograficos para Distomatosis Hepática en ovino y vacuno.

AUTOR, AÑO Y LUGAR	ESPECIE	Nº DE ANIMALES	MUESTRA	PRUEBA	PREVALENCIA
Torrel Pajares (1997) Matadero – Cajamarca	Ovino	85	Suero y materia fecal	ELISA Indirecta y Dennis modificado	90.5% y 69.4%
Casana WM. (2005) Pataz – La Libertad	Ovino	388	Suero y materia fecal	ELISA Indirecta y Dennis modificado	61.8 % y 42.3%
Soto Olarte (2011) Espinar – Cusco	Vacuno	90	Suero sanguíneo y materia fecal	ELISA Indirecta y Dennis modificado	91.1% y 44.4%
Llanos Yepez (2013) Anta – Cusco	Vacuno	95	Suero sanguíneo y materia fecal	ELISA Indirecta y Dennis modificado	97.89% y 72.37%
Barriga NL. (2013) Jorge Basadre- Tacna	Ovino	230	materia fecal	Dennis modificado	25.22%
Ticona D, (2010) Vilcashuaman- Ayacucho	Ovino	207	materia fecal	Dennis modificado	39.1% ± 6.7%
Sangay M. (2013) Pariamarca y Cashapampa – Cajamarca	Ovino	384	materia fecal	Dennis modificado	29% ± 6.4 27% ± 6.3

2.2. BASES TEORICAS

2.2.1. Distomatosis hepática

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial causada por trematodos del genero Fasciola. la especie más común, fasciola hepática, es un parasito hermafrodita que utiliza moluscos del genero Limnaea spp, como hospedador intermediario (Perez, 1994; Garcia et al., 1990)

- **Posición Sistemática** (Borchet A.)

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Trematoda

Sub Clase: Digenea

Orden: Prosostoma

Familia: Fasciolidae

Género: Fasciola

Especie: Fasciola hepática

Nombre común:

Vulgarmente se denomina a la *F. hepatica* con los siguientes nombres: Qallutaca, Alicuyá, Duela del hígado, Gusano del hígado, Jallo Jallo, Saguaype, Palomilla del hígado, Babosa y lenguasa.

Morfología:

La Fasciola hepática es un helminto hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado dorsoventralmente que mide 18X4-13 mm. Posee dos ventosas muy próximas.

La ventral más grande que la oral y un proceso cónico en su extremo anterior donde se encuentra la boca. Los órganos internos (aparato digestivo y reproductor) son muy ramificados, especialmente los ciegos, que son largos y con numerosos divertículos laterales. Los dos testículos ocupan la parte media corporal. El cirro está bien desarrollado y la bolsa del cirro incluye también a la próstata y a la vesícula seminal. El ovario y el útero están localizados anteriormente a los testículos. Las glándulas vitelógenas, formados por finos folículos, ocupan los márgenes laterales

del trematodo. Los conductos de los folículos se unen formando dos transversales que drenan en la glandula de Mehlis, desde la cual comunican con el ootipo. El tegumento está cubierto por numerosas espinas dirigidas hacia atrás. (Cordero del campillo, y otros, 1999)

- **Huevos:** estos miden de 130 a 150 por 63 a 90 micras, posee un opérculo. Su cascara es relativamente delgada y está teñido por pigmentos biliares de tonos amarillos en su interior. Entre numerosas células está el cigoto de color claro y en posición central. (Quiroz H. , 2000)
- **Miracidios:** son los que se forman al final del desarrollo embrionario dentro del huevo, son elementos ciliados que miden 150 por 40 micras. Poseen una mancha ocular en forma de "X", glándulas y espolón cefálico. Estos penetran activamente en el caracol perdiendo su cubierta de cilios y transformándose en esporoquistes. (Borchert, Parasitología veterinaria , 1981)
- **Esporoquistes:** Miden 500 micras de longitud. A partir de la pared de estos, se forman de 5 a 10 masas germinativas que se convierten en redias, las cuales fuerzan la pared del esporoquiste y continúan creciendo en las glándulas intestinales del caracol (Borchert, Parasitología veterinaria , 1981)
- **Redias:** Estas rompen el esporoquiste y migran a otros tejidos como la hepatopáncreas, riñones, etc., donde desarrollan, y a su vez en su interior se realiza una segunda reproducción asexual llegando a formar 15 a 20 cercarias por cada redia (Rojas, 1993), pudiendo alcanzar de

2 a 3 mm. De longitud. Si la primera generación de redias se desarrolla desde el esporocisto. (Manrique, 2002)

- **Cercarias:** Las cercarías liberadas del caracol, miden de 260 a 320 por 200 a 240 micras, sin considerar la cola propulsora que mide 500 micras de longitud. En las cercarías se pueden apreciar algunas estructuras de un trematodo adulto, como ventosas y aparato digestivo. La cantidad de cercarías originadas de un solo miracidio puede llegar a ser de 600. La cercaría nada activamente de un lado para otro y después de poco tiempo se adhiere a la superficie de plantas, perdiendo la cola y transformándose en metacercaria. (Soulsby, 1987)
- **Metacercarias:** Este estadio se halla enquistado en pastos aledaños a zonas con alta humedad; pero también pueden enquistarse en la superficie del agua encerrando pequeñas burbujas de aire que le permiten mantenerse a flote. Tienen una medida alrededor de 250 a 300 por 200 a 250 micras, siendo la forma infectiva del parásito. (Urquhart & Armour, 2001) Los hospederos definitivos se infectan al ingerir plantas o agua con metacercarias.
- **Fasciola juvenil y adulta:** La fasciola juvenil tiene forma de lanceta y una longitud de 1 a 2 mm cuando penetra en el hígado (Urquhart & Armour, 2001). El parásito adulto es hermafrodita, mide de 18 a 50 mm. De largo por 4 a 14 mm. De ancho; el cuerpo es aplanado dorsoventralmente de forma foliacea, ancha anteriormente formado un cono posterior. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas. Posee

una ventosa oral en el extremo superior, otra ventral, a la altura de lo que se podría llamar hombros. El tubo digestivo se bifurca a poca distancia de la ventosa oral, formando ramas primarias y secundarias que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo, abriéndose debajo de la ventosa ventral el poro genital (Quiroz H. , 2000) (Urquhart & Armour, 2001)

- La cronología de los estados evolutivos de fasciola hepática se pueden resumir de la siguiente forma: eclosión de los huevos 2 a 4 semanas, emisión de cercarías por los caracoles de 5 a 12 semanas, periodo pre-patente en grandes mamíferos 10 semanas. El desarrollo del miracidio hasta cercaría a una temperatura de 20°C: tres meses. La sequía es mortal para las meatacercarias y los huevos. (Quiroz H. , 2000)

2.2.2. Ciclo evolutivo

El ciclo de vida de Fasciola hepática es indirecto, es decir necesita de un hospedero intermediario como el caracol. Los parásitos adultos, localizados en los conductos biliares del hígado, producen huevos los cuales son evacuados a través del conducto colédoco al intestino y de ahí son eliminados al exterior juntamente con las heces. En el medio ambiente, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad, los huevos desarrollan y liberan embriones ciliados llamados miracidios, los cuales tienen reservas energéticas para nadar solo por unas pocas horas mientras buscan su hospedero intermediario, un caracol de la familia *Lymnaeidae* (generos *Lymnaea*, *Pseudosuccinea*, *Fossaria*). Si no lo

encuentra, muere; si lo encuentra penetra en él. En el interior de estos caracoles, el miracidio se transforma sucesivamente en larvas llamadas esporocistos, redias y finalmente cercarías, semejantes a pequeñísimos renacuajos de color blanquecinos que abandonan el caracol adhiriéndose luego a la vegetación circundante, donde pierden su cola y se enquistan transformándose en metacercarias, que constituye las formas infectivas.

La infección en el hospedero definitivo se realiza por medio de la ingestión de alimentos (forraje verde) o agua contaminada con metacercarias. En el intestino se disuelve la membrana quística externa y queda libre el joven trematodo que mide 250 micras; penetra activamente a través de la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en el transcurso de 2 a 28 horas; luego penetra en el hígado, perforando la capsula de Glisson y de 4 a 6 días después llega tejido hepático por el que vaga de 6 a 8 semanas para finalmente asentarse en un conducto biliar. (Leguia G, 1988)

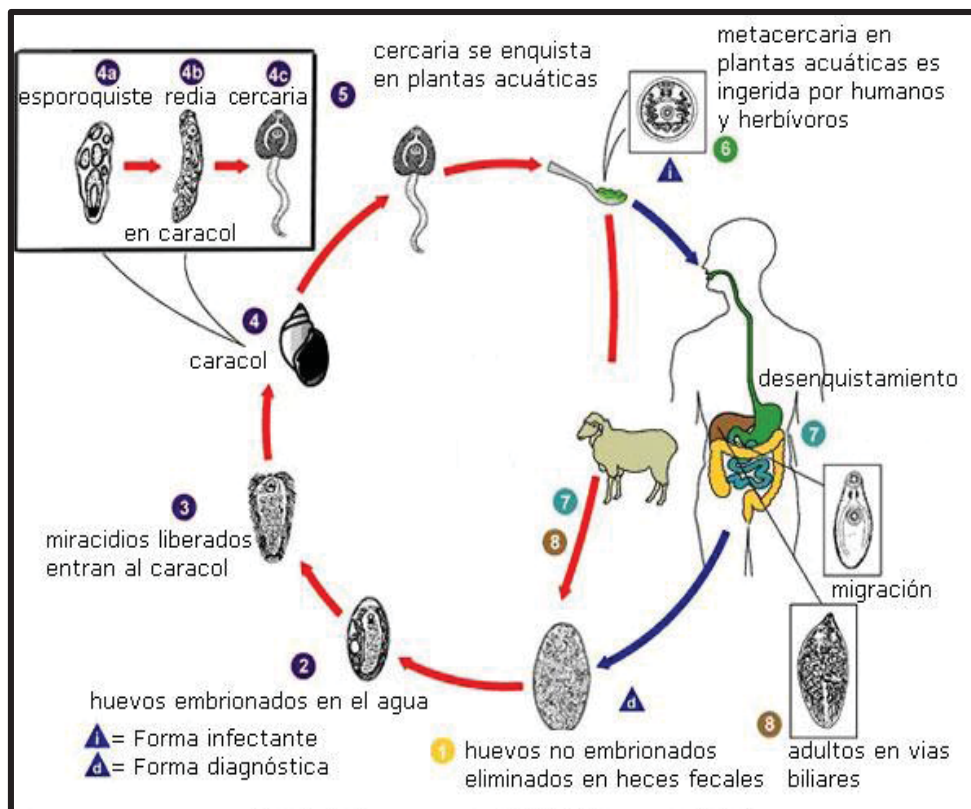


Figura 1. Ciclo biológico de Fasciola Hepática. (Leguía G, 1988)

2.2.3. Patogenia y lesiones

La fasciolosis puede presentar tres formas clínicas: aguda, sub aguda y crónica, cuya aparición está relacionada con la época del año, la disponibilidad de metacercarias en los pastos y el número de metacercarias ingeridas. Esta clasificación se basa principalmente en los hallazgos de necropsia y depende del número de parásitos que se encuentran el hígado y su estado de desarrollo. (Cordero del campillo, y otros, 1999)

La gravedad de un cuadro clínico de la fasciolosis está en relación directa con el número de parásitos, si son escasos, la infección puede pasar inadvertida y quizás el único dato es una eosinofilia elevada. (Quiroz H. , 1984)

A. Fase aguda

Se produce después de una ingestión masiva de metacercarias en un corto periodo de tiempo; síntomas principales: hepatitis hemorrágica, traumática, aguda, con aparición de enzimas mitocondriales de los hepatocitos destruidos (aspartato aminotransferasa AST, glutamato deshidrogenasa GLDH, sorbitol deshidrogenasa SDH) en el plasma desde la segunda semana post-infección hasta el asentamiento de los parásitos en los conductos biliares, peritonitis, anorexia, y pérdida de peso, dolor abdominal, ascitis, palidez de las mucosas, depresión, fiebre, muerte súbita a las 2-5 semanas de la infección masiva a causa de las graves hemorragias hepáticas; esta forma es poco habitual (únicamente en ovejas); su curso de pocos días. (Kassai, 1998)

B. Fase sub aguda

Se produce después de una ingestión masiva de metacercaria a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado; síntomas principales: hepatitis hemorrágica, traumática, sub aguda, peritonitis, hepatomegalia, colangitis, fibrosis hepática, anorexia y pérdida de peso, anemia hemorrágica progresiva, fallo hepático y muerte: evolución de 4-8 semanas. (Kassai, 1998).

Se ha presentado casos de fasciolosis sub-aguda en ovejas y vacunos que han ingerido gran cantidad de metacercarias durante largos periodos de tiempo. Los principales signos clínicos son la pérdida de peso, palidez de mucosa y conjuntiva, en algunos

casos edema submaxilar y dolor en la palpación en la región de proyección hepática. (Blood & Radostit, 1992)

C. Fase crónica

Se produce después de una ingestión moderada y prolongada de metacercarias; síntomas principales: reducción de apetito, anemia hipoproliferativa de desarrollo lento, emaciación, edema submandibular (papo), producido por la colangitis crónica y la fibrosis hepática, pérdida de sangre y proteínas endógenas (hipoalbuminemia); la aparición en el plasma de gamma glutamil transferasa o transpectidasa (GGT) es indicativo de lesiones crónicas de los conductos biliares; la evolución es de varios meses. La ictericia es poco frecuente en la fasciolosis crónica, incluso en presencia de gran cantidad de parásitos y con graves lesiones hepáticas. (Kassai, 1998)

Los animales ingieren pequeñas cantidades de metacercarias durante un periodo de tiempo. Casi toda la población de parásitos en los conductos biliares son adultos. Las fasciolas adultas causan irritación de los conductos, pero los productos metabólicos y las secreciones de las fasciolas son causa de cirrosis con proliferación en los conductos biliares. (Leguia, Distomatosis hepatica en el peru, epidemiologia y control (pag 42), 1991)

En la fase crónica los síntomas son:

- Pérdida de peso
- Edema submandibular (maxilar en botella)

- Palidez de las mucosas e ictericia (amarillento de la piel y mucosa).
- Es frecuente la diarrea y caída de lana por mechones.
- Los animales que sobreviven acaban agotados periodos prolongados.
- Los ovinos en producción pierden la leche presentan una diarrea crónica y anemia, generalmente asociado con nematodiasis.

2.2.4. Acción parasitaria

La Fasciola hepática es capaz de producir grandes alteraciones en el hospedero, que pueden resumirse en cuatro acciones principales:

A. Acción traumática

La Fasciola produce con sus espinas y ventosas una intensa irritación de las células epiteliales, que como reacción defensiva modifican su estructura. Ante la extensa erosión y necrosis de la mucosa biliar se desarrolla una intensa reacción inflamatoria que interesa a la lámina propia adyacente. La mucosa de los conductos biliares, incluso la no asociada directamente con los vermes, se engrosa y esta hiperplásica.

Los vermes alcanzan al hígado unas semanas después de la ingestión de las metacercarias y origina un cuadro patológico, caracterizado por necrosis y hemorragias. Se desarrolla fibrosis hepática, como consecuencia como fase migratoria y colangitis

hiperplásica, por la presencia de vermes adultos en los conductos biliares y vesícula. (Cordero del campillo, y otros, 1999)

B. Acción obstructiva

Al localizarse en los conductos biliares, ejerce una acción mecánica de obstrucción al fibrosarse los conductos y por la misma presencia del parásito. (Olsen, 1997)

C. Acción hematofaga

El desarrollo de la anemia gradual coincide con la presencia de las fasciolas en los conductos biliares. Estas observaciones confirman las conclusiones que considera la alimentación hematofaga propia de las fasciolas adultas, siendo los vermes inmaduros histiofagos. Actualmente existen pocas dudas sobre el origen hemorrágico de la anemia hipoalbuminemia tan características de la fasciolosis crónica. Mediante el marcado de glóbulos rojos, con radioisótopos, se ha calculado la pérdida hemática diaria por cada verme en aproximadamente 0.5-1 mL, de sangre. Estudios eritrocínicos demuestran la relación entre la anemia e hipoalbuminemia y el paso de la sangre al aparato digestivo por vía biliar, lo que representa una pérdida considerable de glóbulos rojos y proteínas. (Cordero del campillo, y otros, 1999)

D. Acción toxica

Los productos de excreción del parásito, así como los constituyentes de los dístomas muertos o removidos por tratamientos antiparasitarios, pueden producir síntomas nerviosos,

debido a la acción tóxica de tales sustancias, situación que se agrava por las lesiones fibroticas irreversibles que afectan a la capacidad desintoxicante del hígado.

2.2.5. Epidemiología de la enfermedad

A. Factores relacionados al agente

La fasciola infecta un amplio rango de especies domésticas y silvestres (alpacas, ovinos, vacunos, cerdos, venados, vizcachas, etc.). En el ovino puede vivir hasta 11 años y es altamente prolífico, pudiendo producir hasta 20000 huevos por día. Por otro lado, de cada miracidio que ingresa a un caracol se desarrollan entre 600 a 1000 cercarias, lo que incrementa considerablemente su potencial de infección. (Leguia, Distomatosis hepática en el Perú, epidemiología y control (pág 42), 1991)

Los huevos pueden sobrevivir varios meses en condiciones húmedas especialmente durante la primavera-verano, en tanto que la sequedad los destruye rápidamente. La estivación de los caracoles produce la muerte de las cercarias y el desarrollo de los esporocistos y redias es inhibido, pero posteriormente se reactiva cuando cesa el proceso. La metacercaria es muy resistente a los factores adversos del medio ambiente y bajo condiciones de humedad y bajas temperaturas, es capaz de sobrevivir más de un año. Sin embargo, la desecación prolongada y las hidrataciones y deshidrataciones alternas son letales para su viabilidad. (Ollenshaw, 1971)

La fasciola hepática posee una gran especificidad hacia su hospedador intermediario ya que solo se desarrolla en caracoles de la familia *Lymnaeidae*. Estos caracoles están distribuidos en todo el mundo, aunque son más abundantes en las zonas templadas del hemisferio norte. (Malek, 1985)

No todas las especies de lymneidos son igualmente susceptibles a fasciola hepática y tanto los factores extrínsecos (condiciones ambientales de cada región) como los intrínsecos (estado nutricional, tamaño, madurez sexual, etc.) influyen en el rol de cada especie como hospedador intermediario. (Matos, Ueno, Goncalves, & Almeida, 1997).

Algunos lymneidos actúan como el hospedador intermediario principal de fasciola hepática y otro juegan un rol secundario en la transmisión del parásito (Boray J. C., 1981)

Factores de estabilidad: longevidad de la infección, producción indefinida de huevos por los trematodos adultos (más de 20000 huevos/trematodo/día). Así mismo las metacercarias sobreviven mejor en la hierba y el heno a temperaturas inferiores a 20°C (resisten durante muchas semanas a 2-4° C), pero mueren rápidamente a temperaturas elevadas y con desecación, en el estiércol y ensilado perduran durante 10-14 días (Kassai, 1998)

B. Factores relacionados al hospedador

Los caracoles *Lymnaea* son dextrógiros y tiene capacidad reproductiva. Un solo caracol puede producir hasta 25000

descendientes y actuar en forma hermofrodita. Son semianfibios y proliferan en abundancia en las riberas de los riachuelos, acequias, canales de curso lento o en acumulaciones de agua permanentes o temporales como pantanos, charcadas, ojos de agua, pastizales húmedos, etc. El suelo arcilloso con pH ligeramente ácido facilita su establecimiento. Bajo condiciones de temperatura y humedad adecuadas se reproducen rápidamente; pero en situaciones adversas, principalmente de sequía, se introducen en el subsuelo húmedo sufriendo prolongados periodos de “estivación” o “hibernación”. En esta forma puede sobrevivir hasta por un año. En las regiones andinas los caracoles estivan entre mayo a setiembre, produciéndose hasta 3 generaciones de caracoles al año (Leguia, Distomatosis hepatica en el Perú. Epidemiologia y Control, 1988)

Los hospederos definitivos se clasifican en tres grupos atendiendo a su receptividad. Así, se habla de un primer grupo que englobaría aquellos hospedadores definitivos que reaccionan rápidamente frente al parasito, evitando su desarrollo, como son el cerdo, el perro, o el gato; el segundo grupo estaría integrado por aquellos hospedadores que reaccionan con retraso ante una implantación en hígado y serian la vaca, el caballo y el hombre; por último el tercer grado lo formarían los hospedadores más susceptibles, en los que la productividad parasitaria es muy alta y existe una marcada patogenicidad (oveja, cabra, conejo). En España se ha encontrado fasciola hepática parasitando ovejas, cabras, vacas, gamos, asnos,

caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres, y a la especie humana (Rojo & Ferre, 1999)

C. Factores relacionados al medio ambiente

La latitud y la altitud determinan la temperatura. La temperatura media de la atmosfera disminuye 0.5°C por cada grado que aumente la latitud y por cada 100m de elevación en la latitud (Flores, Reyes, & Guzman, 2008). A su vez las altas precipitaciones o el riego artificial en zonas con escasa pendiente o mal drenaje favorecen la acumulación de agua en el subsuelo. Cuando la temperatura oscila entre los 10°C y 30°C y hay suficiente humedad en el suelo se generan condiciones favorables para el establecimiento y el desarrollo de los caracoles de la familia Lymnaeidae, que actúa como hospedadores intermediarios de la fasciola hepática (Torgerson & Claxton, 1999)

El rango de temperatura ambiental para el desarrollo de las fases ambientales del parasito se halla entre 10^a 30°C la temperatura critica mínima es de 10°C por debajo de esta temperatura no hay desarrollo ni de formas larvarias del parasito ni del hospedador intermediario, entrando en una suerte diapausa o hibernación. La metacercaria merced a la cubierta quística, puede sobrevivir 9-11 meses especialmente en lugares húmedos (Rojas, 1993)

2.3. INMUNOLOGÍA

2.3.1. Anticuerpos

Es una glucoproteína secretada por las células plasmáticas como producto de una respuesta inmune de base humoral y que presenta la propiedad de unirse de forma específica al determinar antígeno que indujo a su síntesis.

A. Estructura de anticuerpo

Estructuralmente, están formados básicamente por cuatro cadenas polipeptídicas. Dos de ellas, denominadas pesadas o cadenas H (Heavy: pesado), con un peso molecular de entre 55 a 77 kilodalton (kDa) y dos ligeras o L (Light) con un peso molecular de entre 23 a 26 kDa. Las dos cadenas H y las dos L mantienen idéntica estructura entre ellas. Las dos cadenas se unen entre sí covalentemente mediante puentes de azufre y a cadena pesada se une a la ligera mediante un puente disulfuro. Cada cadena pesada se une a una ligera mediante un puente disulfuro. Cada una de las cadenas consta de una región constante y otra variable. (Boero, 1976)

Si una molécula de inmunoglobulina es tratada por proteasas, como la pepsina o papaína, se parte en dos fragmentos denominados: Fab, de las palabras inglesas "antigen binding Fragment" y Fc (Crystalizable Fragment). En el primer fragmento (Fab), reside la especificidad de la inmunoglobulina y por tanto su capacidad para reaccionar con el antígeno, mientras que el segundo fragmento (Fc)

realiza las funciones efectoras de las inmunoglobulinas (fijación del complemento, receptores celulares).

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras, están formadas por unas estructuras proteicas conservadas denominadas "Dominio de Inmunoglobulinas". Estos dominios están formados por aproximadamente 110 aminoácidos. Las cadenas ligeras están formadas por dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL) y las cadenas pesadas por un aparte variable (VH) y tres (IgG e IgA) o cuatro (IgM e IgE) constantes (CH1, CH2, CH3 Y CH4). Los dominios son idénticos en las dos cadenas ligeras entre si y en las dos cadenas pesadas. (Borchert, Parasitología Veterinaria. traducido del alemán por Cordero., 1975)

En las cadenas H también existe una región adicional, que no forma parte de los dominios, denominada región bisagra. La región bisagra está localizada entre los dominios CH1 y CH2 y permite la movilidad a las inmunoglobulinas.

El análisis de aminoácidos de la región bisagra demuestra que está formada por un gran número del aminoácido Prolina lo que permite su flexibilidad, pero también su susceptibilidad al ataque proteasas, de ahí, su fragmentación en Fab y Fc.

Los dominios variables (VL y VH) tiene como función la unión al antígeno y, por tanto, son los responsables de la especificidad de la inmunoglobulina, mientras que los dominios constantes permiten la diferenciación de los cinco isotipo de cadenas pesada (m, g, e, a, d)

que formaran las inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgE, IgA e IgD) y de los dos tipos de cadenas ligeras: capa (K) y landa (L). así como son los responsables de las funciones efectoras de las inmunoglobulinas (fijación del complemento, receptores celulares)

La variabilidad observada en las zonas variables de ambas cadenas (L y H) se localiza en tres segmentos, alrededor de 10 aminoácidos, denominados regiones hipervariables, también conocidas como: CDR1, CDR2, CDR3 (Complementary Determining Regions o Región determinante de complementariedad). Estos segmentos forman en denominado sitio de unión con el antígeno. Por lo tanto, cada molécula de inmunoglobulina tiene dos sitios de unión con el antígeno. (Boray J. , 9. flukes of domestic animals En parasites pests and predators, Gaafar et al editors, Elsevier pub., 1985)

B. Afinidad del anticuerpo

La fuerza de unión entre un anticuerpo y un solo antígeno se denomina afinidad. Es la suma de las fuerzas de sus enlaces, es la atracción entre antígeno y anticuerpo. (Boray J. , chemotherapy of infection with fasciolidae , 1997)

C. Avidéz del anticuerpo

Los Ac tienen al menos dos zonas de unión con el antígeno. Los antígenos también pueden ser multivalentes, con varios determinantes antigénicos. La fuerza de unión en este caso es la avidéz.

D. Especificidad del anticuerpo

Cuando un anticuerpo solo puede reaccionar con un antígeno se dice que ese anticuerpo es específico.

2.3.2. Antígeno

Es una molécula extraña reconocida por el sistema inmunitario, en concreto por anticuerpos preformados o por receptores específicos en linfocitos B o T. Tradicionalmente se aplica a los inmunógenos o moléculas que desencadenan la respuesta inmune. (Manual de inmunología veterinaria, 1984).

El antígeno es la porción de un microorganismo o parásito que contiene sitios específicos de reconocimiento de la rama humoral (anticuerpos) o células (linfocitos) de la respuesta inmunitaria. A estos sitios se les denomina epítopes. Los denominados antígenos crudos por lo general son extractos solubles de los microorganismos o parásitos. Se constituyen por una variedad de componentes, tanto del agente como de las células en las cuales se aloja o del medio de cultivo. En los antígenos crudos, la mayor parte de los componentes son irrelevantes, pero pueden ser reconocidos por anticuerpos o linfocitos por otros microorganismos o parásitos y dar reacciones falsas positivas o negativas por tanto es deseable purificarlos. (Chandra, 1979)

Lo más conveniente es utilizar antígenos más definidos. Una posibilidad es utilizar los productos de excreción/secreción, los cuales tienen un menor número de componentes y reduce la posibilidad de reacciones cruzadas

A. Estructura de los antígenos

El número de posibles Ac frente a un Ag es elevado debido a que los Ag son estructuras tridimensionales y presentan múltiples EPITOPOS (zona del Ag que es reconocido por el sistema inmunitario) que pueden ser reconocidos por los LB o LT. Los epitopos o determinantes antigénicos son cada uno de los sitios discreto de una macromolécula que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico o por un TRC específico. Son las regiones inmunológicamente activas de un inmunogeno (las que se unen de hecho a un receptor de linfocitos o aun Ac libre). En este sentido las macromoléculas son antígenos multivalentes con muchos tipos de determinantes antigénicos distintos. (Cordero, 1999)

En el Ag hay regiones inmunodominantes a las que se unen la mayoría de los Ac. Estas regiones se localizan en la zona externa del Ag, como las asas peptídicas que carecen de estructuras rígidas. También se han encontrado estas características en zonas móviles donde existe una cierta flexibilidad del epitopo, y las regiones CDR de Ac pueden alcanzar la energía óptima de unión.

2.3.3. Reacción Antígeno – Anticuerpo

La unión antígeno-anticuerpo es específica, cada anticuerpo reconoce y se une a un determinado antígeno. Esta unión se realiza por medio de uniones intermoleculares entre el antígeno y la zona del anticuerpo y da

lugar al complejo antígeno-anticuerpo según el modelo llave-cerradura.
(Copa , 1999)

2.4. PRUEBA DE ELISA

Ensayo de Inmunoabsorción ligada a enzimas (Elisa).

Definición: Es una prueba de unión primaria que detecta enlace específico antígeno y anticuerpo y cuantifica los inmunocomplejos formados mediante el marcador enzimático que actúa con un sustrato como génico apropiado. El grado de transformación del sustrato incoloro a un producto coloreado se cuantifica objetivamente por espectrometría y es proporcional a la cantidad de inmunocomplejos formados. (Universidad Complutense de Madrid, 2007)

La técnica de Elisa, se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una base sólida (placas de inmunolon) impregnadas de anticuerpos que directa o indirectamente producen reacción cuyo producto es la observación de una coloración debido al cromógeno añadido a la última prueba. Puede ser medido mediante un lector de ELISA o mediante observación visual. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmuno ensayo ideal, es versátil, sencillo y simple en una reacción, se basa en el empleo de reactivos para el diagnóstico y despistajes de enfermedades principalmente de origen infeccioso.

El principio de Elisa de basa en determinar si una proteína particular está presente en una muestra y con posibilidad de cuantificarla.

Hay dos variaciones principales en este método: en la primera puede determinarse cuanto anticuerpo está en la muestra, o puede determinarse cuanta proteína es limitada por un anticuerpo. (Colona, 1995)

Se ha realizado múltiples variantes de ensayo de Elisa, siendo los más utilizados son los siguientes:

2.4.1. Elisa indirecta

Ensayo de Elisa simple de dos capas; en la actualidad las placas de Elisa se prepararán cubriendo los pocillos o en celdas con la solución en las que se sospecha se encuentran el antígeno, se incuban con anticuerpos marcados e indica la presencia del antígeno en la solución analizada. Menciona también que necesariamente incluyen controles negativos que son muestras del mismo tipo analizadas, pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. (Cuadros, 2005)

2.4.2. Elisa competitivo

Esta técnica también es muy común para la detección de anticuerpos específicos. Tenemos un anticuerpo (monoclonal o policlonal) de un antígeno conocido, este antígeno ha sido unido previamente a la placa. Se conoce como ELISA competitivo porque se incubaba el suero con el antígeno anterior a su incubación con el antisuero unido a la placa. Por lo tanto, ambos compiten por el antígeno. El método de ELISA es una prueba de elección en el diagnóstico de numerosas enfermedades infecciosas y parasitarias, y es de gran rentabilidad de veterinaria al analizar simultáneamente y en un corto periodo de tiempo grandes colectivos, siendo, por tanto, útil en el sondeo serológico de poblaciones para conocer la situación sanitaria frente a una situación determinada. Es una prueba muy sensible para detectar bajos niveles de anticuerpos. Esto hace posible la detección de animales de estadios tempranos de la

infección, portadores, casos de infección sin el estímulo de respuesta hormonal, etc. La técnica puede emplearse como herramienta de control con el seguimiento, por análisis repetidos, de explotaciones negativas a una infección o para confirmación de la positivas.



Figura 2. Esquema de representación de Elisa Competitivo

(Viromedica, 2010)

Pasos de ELISA competitivo:

1. La incubación del suero de prueba con el antígeno.
2. Adición de esta mezcla a la placa, previamente incubado con el antisuero.
3. Adición del conjugado.
4. Adición del sustrato, en este caso la ausencia del color significa una muestra positiva. (Gorman, 1994)

a) Ventajas de la prueba de ELISA:

- Alta sensibilidad y especificidad.
- Método rápido.
- Los reactivos son estables.

- Resultado visual

b) Desventajas de la prueba de ELISA:

- Costo de micro placas.
- Costo de equipo automatizado.

2.5. ANÁLISIS COPROPARASITOLÓGICO

La detección de huevos de *Fasciola hepática* en las heces de los animales sospechosos es útil para diagnosticar la fasciolosis crónica, muchas veces solo caracterizada por una reducida productividad. Se ha descrito numerosos métodos, desde simples extensiones hasta laboriosas técnicas cuantitativas. El propósito de estas últimas es concentrar los huevos a partir de una muestra de heces, mediante métodos de flotación o de sedimentación. Los métodos de flotación utilizan soluciones de alta densidad como un sulfato de zinc o el yodomercuriato potásico. El inconveniente de las técnicas de flotación es la deformación y colapso de los huevos por fenómenos osmóticos, debido a las soluciones utilizadas. La flotación de sulfato de zinc es una técnica muy difundida, pero ineficaz ante escasas eliminaciones de huevos (menores de 10 hg), recomendándose, entonces los métodos de sedimentación. Los métodos de sedimentación se basan en la mayor densidad de los huevos de los trematodos que el detritus que se hallan en las heces, lo que permite concentrarlos en el sedimento tras repetidos lavados. La adición de un colorante de contraste al sedimento permite destacar el color amarillo dorado de los huevos, en las primeras infecciones agudas los análisis coprológicos son negativos; el hallazgo de 300-600 hg en ovinos y entre 100-200 en vacunos,

indican una infección probablemente patógena, que requiere la aplicación de un fasciolicida. (Cordero del campillo, y otros, 1999)

El diagnóstico de laboratorio puede realizarse en forma directa por la identificación y cuantificación de huevos de *fasciola hepática* que no es posible hasta 8 a 10 semanas post infección. El examen coproscopico comprende técnicas tales como: sedimentación y filtración con malla metálica. El método de sedimentación es el más utilizado por su sencillez y bajo costo y fue considerado como la regla de oro tal como se conoce al diagnóstico de rutina establecido en las unidades pecuarias, el que consiste en tomar aproximadamente tres gramos de muestra fecal y si resulta positiva es suficiente para aplicar el tratamiento (Borchert, Parasitología veterinaria , 1981)

2.5.1. Técnica de sedimentación

Se basa en que el tiempo de caída de los huevos de *Fasciola hepática* en el agua es de 100 mm/minuto, más rápido que el de la caída de detritos de las materias fecales. El tiempo de sedimentación debe de ser de 3 a 4 minutos (Abbas , 2002)

2.6. MÉTODO DE DENNIS MODIFICADO

Este método de Dennis Modificado, sirve para el hallazgo de la *Fasciola*, *Paramphistomun* y *Metastrongylus*, diseñado especialmente para *Fasciola* cuyos huevos requieren de un tratamiento cuidadoso y no solo se le debe someter a presiones. Por ejemplo, la centrifugación, tiende a destruirlo. Se colecta una muestra de 2 a 3 gramos de heces para desmenuzarlo en el mortero u homogenizarlo con la bagueta, agregando progresivamente 50 ml de solución detergente, filtrar en la copa de precipitación o en un tubo de prueba mediante

un tamiz, dejar sedimentar durante 10 a 12 minutos y luego decantar el sobrenadante y re suspender el sedimento con otros 50 ml de solución detergente y repetir el paso anterior, al sedimento agregar 4 a 6 gotas de lugol fuerte, agitar y vaciar en placa Petri para su observación (Rojas, 1993)

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1. LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en la comunidad campesina de Pfullpuri puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo Tomas, de la provincia de Chumbivilcas, del departamento de Cusco.

La principal actividad económica que desarrolla esta comunidad es la actividad pecuaria, en relación a la producción agrícola, en primer orden de importancia económica es la crianza de ganado ovino.

3.2. TRABAJO DE LABORATORIO

El trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Sanidad Animal “ATILIO PACHECO PACHECO” Desarrollo y validación de pruebas Serológicas y Moleculares para la Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de la Escuela Profesional de Zootecnia, departamento académico de Ganadería, Área de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

3.2.1. Ubicación política

- Región : Cusco.
- Departamento : Cusco.
- Provincia : Chumbivilcas.
- Distrito : Santo Tomás.
- Comunidad : Pfullpuri puente Ccoyo Uscamarca

3.2.2. Ubicación geográfica

- Latitud Sur : 14° 27' 01'' S
- Longitud Oeste : 72° 05' 00'' W
- Altitud Máxima : 4400 m.s.n.m.
- Altitud Mínima : 3678 m.s.n.m.

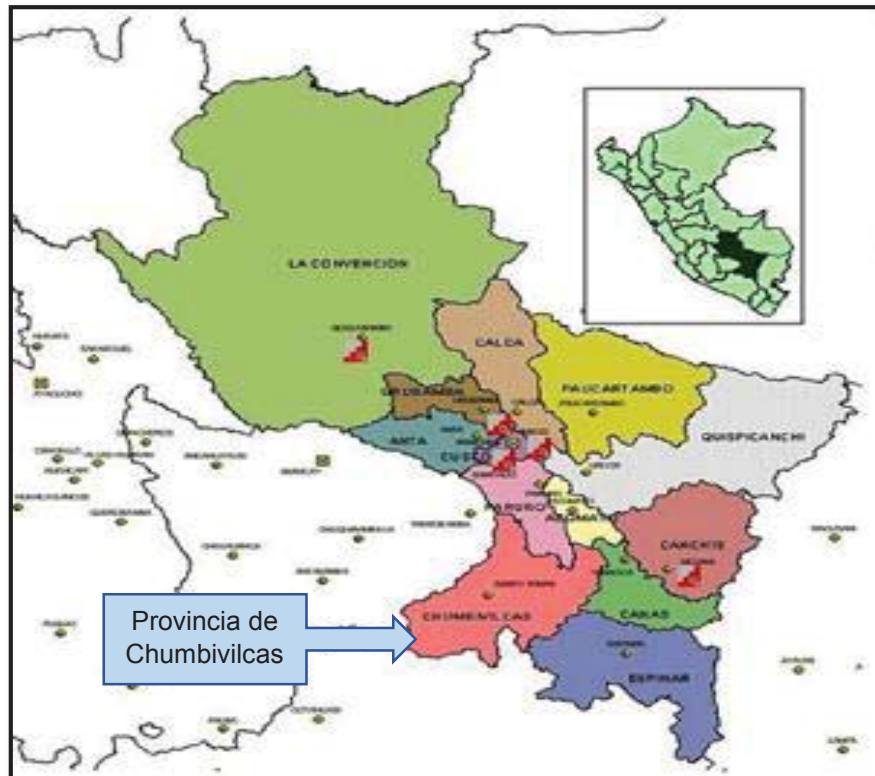


Figura 3. Mapa de ubicación provincial (INEI, 2010)



Figura 4. Mapa de ubicación del distrito de Santo Tomás (INEI, 2010)

3.3. DATOS CLIMÁTICOS

3.3.1. Clima

El clima de Santo Tomás es frío, moderadamente lluvioso y con amplitud térmica moderada. La media anual de temperatura máxima y mínima (periodo 2004-2008) es 16.6°C y 2.0°C, respectivamente. (MINAM & IGP, 2004-2008)

3.3.2. Precipitación

La precipitación media acumulada anual para el periodo 1964-1972 es 768.6 mm/año. (MINAM & IGP, 2004-2008)

3.4. MATERIALES BIOLÓGICOS

- Ganado ovino (Raza Criolla, Hampshire Down y cruzados)
- Sangre para examen serológico (Prueba de Elisa).
- Heces para examen coproparasitológico (Dennis Modificado).

3.5. MATERIALES DE CAMPO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE

- Agujas vacutainer 18 G
- Tubos vacutainer con separador de suero alcohol
- Torundas de algodón
- Gradillas
- Termo
- Etiquetas/ marcador
- Cámara fotográfica

3.6. MATERIALES Y EQUIPOS PARA LA CONSERVACIÓN DE SUERO

- Refrigeradora
- Centrifuga Congelador a – 20°C
- Viales criogénicos
- Pipetas Pasteur desechables
- Etiquetas/ marcador

3.7. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

3.7.1. Equipos e instrumentos

- Estufa de incubación 38 °C
- Congelador – 20°C
- Lavador de placas Elisa
- Lector de micro placas de Elisa
- Refrigeradora
- Micro pipetas de 5 - 10 - 50 - 100 y 1000 µl.
- Matraz Erlenmeyer

- Probeta Graduada

3.7.2. Materiales

- Tips de 20-200 -1000
- Papel absorbente
- Parafilm
- Agua destilada

3.7.3. Reactivos

- Kit de Fasciola Hepática (antígeno y anticuerpo) Bio-X Diagnostic S.A. (EE. UU.)
- Solución de lavado
- Bufferr de dilución
- Conjugado de inmuno globulina IgG1 anti ovina
- Suero positivo
- Solución de cromógeno
- Solución subtrato de peróxido de hidrogeno
- Solución estop

3.8. EQUIPOS DE LABORATORIO (EXAMEN COPROLÓGICO)

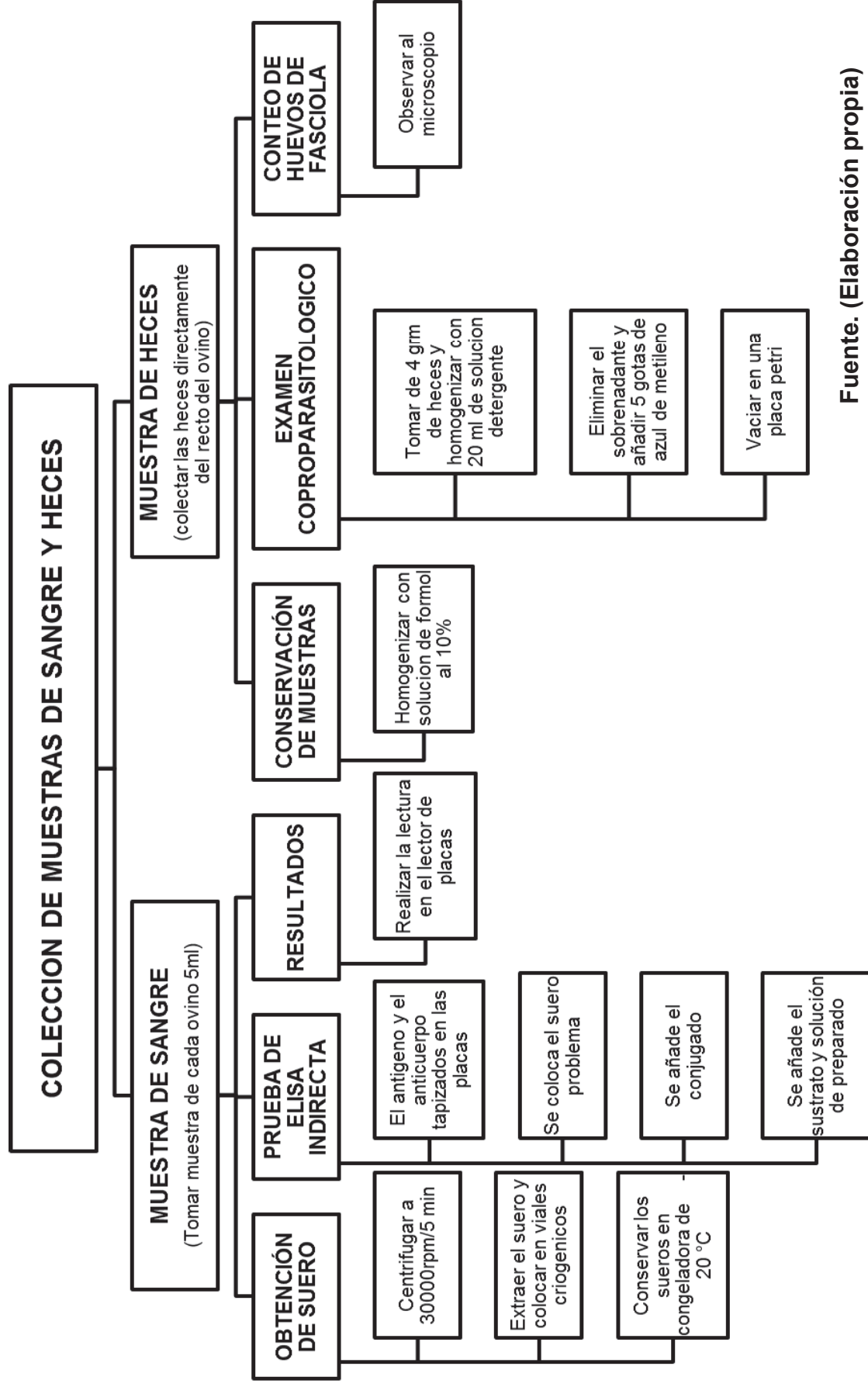
- Mortero
- Tamices 150, 75 y 63micras
- Placas Petri
- Copa de precipitación
- Agua destilada
- Solución detergente

- Espátula
- Microscopio óptico
- Azul de metileno

3.8.1. Materiales de campo para la recolección de heces

- Mameluco
- Botas de jebe
- Bolsas plásticas para recolección de muestras
- Caja térmica
- Fichas clínicas
- Marcador
- Soga
- Cámara fotográfica

FLUJOGRAMA DE ELISA INDIRECTA Y DENNIS MODIFICADO



Fuente. (Elaboración propia)

3.9. MÉTODOS DE MUESTREO

3.9.1. Población

La población de ganado ovino en la Comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo Tomas, de la provincia de Chumbivilcas, según la agencia agraria sede Santo Tomas y la municipalidad provincial de Chumbivilcas, atreves de la oficina desarrollo económico local proyecto ovinos gestión 2015-2018 está constituido por 3582 cabezas de ovinos. (Agencia Agraria Santo Tomas, 2012)

3.9.2. Tipo de muestreo

El tamaño de la muestra para la evaluación de las pruebas serológicas y coproparasitológico serán de acuerdo a la siguiente fórmula de MITAC

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

Dónde:

- N: Tamaño de la población.
- Z: 1.96, nivel de confianza que se da a la muestra.
- p: Variabilidad 0.5
- q: Variabilidad 0.5
- E: Precisión o error Experimental 0.1% al 90%.
- n: Tamaño de muestra

El número de animales que han sido sometidos el presente trabajo de investigación es de 94 ovinos de una población de 3582 animales de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo-tomas provincia Chumbivilcas, resultado que se aplicó para la prueba de Elisa indirecta y Dennis modificado.

Tabla 2. Distribución de muestras de ovinos de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca

ESPECIE	MADRES	BORREGUILLAS	CARNEROS	TOTAL
Ovino	67	20	07	94

Fuente. (Elaboración propia)

3.9.3. Procedimiento de muestreo

- Las muestras de sangre se tomaron directamente de la vena cefálica radial con la ayuda de una aguja vacutainer y un tubo con separador de suero al vacío la cantidad de 5ml.
- Las muestras de heces se obtuvieron directamente del recto del animal, la cantidad de 4 gr en horas de la mañana. Cabe indicar que las heces se obtuvieron de los mismos animales que se tomaron indistintamente para la recolección del suero sanguíneo, dicha muestra se colocó en bolsas de plástico las que fueron debidamente rotuladas.

3.10. MÉTODOS DE EVALUACIÓN

3.10.1. Metodología de campo

A. Obtención de muestras de sangre

La extracción de la sangre se realizó directamente de la vena cefálica del ovino el que esta previamente sujetado. Se realiza la hemostasia necesaria sobre la vena cefálica del animal y con la ayuda de un casquete y la aguja vacuteiner se extrae la sangre a un tubo al vacío con separador de suero debidamente rotulado con sus respectivos datos (nombre, categoría del animal, fecha y zona de recolección) y se deposita en un recipiente con pilas de hielo y protegido de la luz solar se transporta al laboratorio Atilio Pacheco Pacheco para ser centrifugado y se pueda retirar de cada tubo el respectivo sueros y estos ser congelados debidamente.



Figura 5. Toma de muestra de sangre

B. Obtención de muestras de heces

Esta tarea se realizó en horas de la mañana. Las muestras de heces se obtuvieron directamente del recto del ovino introduciendo los dedos protegida con un guante de látex y una bolsa plástica en la que se extrae y se transportara el material biológico al laboratorio para ser conservado con una solución de formol al 10 % para que los huevos de las fasciolas se fijen y no eclosionen.



Figura 6. Toma de muestras fecales

3.11. METODOLOGÍA EN LABORATORIO

3.11.1. Método Elisa indirecta

Fundamento: El anticuerpo conocido es conjugado con una enzima, en la cual se producirá la reacción antígeno-anticuerpo y luego se añadirá el sustrato específico que producirá una modificación de color y esta cuantificará mediante lectora de Elisa.

3.11.2. Procedimiento del método de Elisa indirecta

Protocolo de desarrollo de la prueba de Elisa de acuerdo al kit para serodiagnóstico de fasciola hepática del laboratorio Bio-X Diagnostics S.A de Fasciola hepática (ovinos y bovinos)

- Poner todos los reactivos a 21°C por lo menos 20 minutos antes de iniciar el test.
- Quitar la micro placa de su envoltura.
- Para muestra de suero sanguíneo colocar buffer de dilución 1 ml, preparado como se indica en la sección “composición del kit” en tubos de hemolisis de 5 a 10 ml. Añadir 10 ul de las muestras de suero a cada uno de estos tubos y agitar brevemente en un agitador mecánico.
- Diluir el suero positivo del kit 1/100.
- Distribuir 100 ul de las muestras en cada pocillo respetando la pauta siguiente: suero positivo A1, A2; suero problema pozos B1, B2.
- Incubar la placa a 21°C durante una hora, cubrir la placa con parafilm.
- Enjuagar la placa con la solución de lavado preparada como se indica en el kit; como sigue, vaciar el líquido de la placa poniéndola volteada sobre un papel absorbente limpio para quitar todo el líquido, llenar los pocillos con la solución del lavado y repetir el procedimiento de lavado por tres veces.

- Diluir el conjugado 1:50 en el buffer de dilución (por ejemplo, para una placa diluir 250 ul de solución madre de conjugado el 12250ml de diluyente) añadir 100ul de la solución diluida del conjugado a cada pocillo e incubar por una hora a 21°C cubriendo con parafilm.
- Lavar la placa como se describe en el paso ocho.
- Añadir 100 ul de la solución de cromógeno a cada pocillo de la placa. La solución cromógena debe ser incolora cuando se pipetea a cada pocillo, si aparece un color azul esto indica que la solución se ha contaminado.
- Incubar durante 10 minutos a 21°C protegido de la luz o al descubierto, esto está dado como un tiempo referencial pudiendo este tiempo ser mayor o menor.
- Después de esta incubación añadir 50ul de la solución de frenado.
- Se procederá a realizar la lectura de las muestras con el lector de Elisa, donde se medirá la longitud óptica de 450 nm.



Figura 7. Kit de Fasciola hepática a temperatura ambiente



Figura 8. Preparación de la solución de lavado

A. FLUJOGRAMA DE LA METODOLOGÍA DE ELISA INDIRECTA PARA LA FASCIOLA HEPÁTICA



Figura 9. Dilución de muestras y controles con el diluyente de la muestra y cubra los pocillos e incube a 18 – 26 °C durante 30 minutos (\pm 2 minutos)



Figura 10. Incubación de la placa perfectamente sellada para evitar la evaporación a 37 °C (\pm 2 °C) durante 60 minutos (\pm 5 minutos)



Figura 11. Lavado de las placas culminada la incubación de 60 minutos (\pm 5 minutos) con 300 μ l de solución de lavado por 3 veces



Figura 12. Se agregó 100 μ l de sustrato TMB en cada pocillo y cubra los pocillos e incuba a 18 – 26 °C durante 10 minutos (\pm 1 minuto)



Figura 13. Se agregó 50 μ l de la solución frenado en cada pocillo para detener la reacción y medir la absorbancia a 450 nm

Tabla 3. Validación para valores medios de la densidad óptica (DO)

VALORES MEDIOS DE LA DENSIDAD ÓPTICA (DO)	
Control Negativo	DO (450nm) < 0.200
Media Control Positivo - Media Control Negativo (P- N)	P- N ≥ 0.300

B. DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA DE ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA DISTOMATOSIS HEPÁTICA

• **PLACA 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
B	N	N	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
C	TR	TR	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
D	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
E	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
F	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
G	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
H	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH

• **PLACA 2**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
B	N	N	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
C	TR	TR	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
D	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
E	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
F	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
G	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH
H	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH

- **PLACA 3**

	1	2
A	P	P
B	N	N
C	TR	TR
D	FH	FH
E	FH	FH
F	FH	FH
G	FH	FH

LEYENDA:

P: Pocillo con suero positivo

N: Pocillo con suero negativo

TR: Tracer, marcador

FH: Pocillos con suero problema.

3.11.3. Interpretación de los resultados

Restar cada valor registrado para las columnas impares la señal del pozo de control negativo correspondiente y anote el resultado. Al realizar este cálculo, tenga en cuenta los valores negativos que puedan existir. Realice las mismas operaciones para la columna correspondiente a los controles positivo y negativo.

La prueba solo se puede validar si el positivo de una diferencia en la densidad óptica a 10 minutos que es mayor que 0,800 y el suero

negativo produce una diferencia en la densidad óptica menor que 0.300.

Dividir la señal de la lectura para cada muestra obtenida bien por la señal correspondiente de suero de control positivo y multiplicar este resultado por 100 para expresar como porcentaje.

$$\text{VAL } (\mu\text{e}) = \frac{\text{Delta OD muestra} * 100}{\text{Delta OD positivo}}$$

INTERPRETACION:

Tabla 4. Interpretación de resultados de la prueba de Elisa indirecta

	0	+/-	+	++	+++
VAL	<10%<=	<15%<=	<45%<=	<75<=	>75

Fuente. (Bio-X Diagnóstico S.A.)

LEYENDA:

- 0:** No presenta ninguna infestación de Fasciola hepática
- +/-:** Infestación dudoso
- +**: Infestación leve
- ++:** Infestación moderada
- +++:** Infestación alta o grave

3.12. MÉTODO DE DENNIS MODIFICADO

- Pesar 2-3 g. de heces en una balanza.
- Se desmenuzo la muestra utilizando un mortero, Mezclar las heces con 50 ml de agua fría y homogenizar.
- Sobreponer 3 tamices de 150, 75 y 63 micras.
- Pasar las heces por el tamiz de 150 micras con abundante agua haciendo movimientos giratorios.
- Retirar el tamiz de 150 micras, echar el agua sobre el segundo tamiz de 75 micras, hasta que fluya fácilmente.
- Repetir la misma operación hasta transferir totalmente a un vaso de precipitación de 250 ml. con chorro de agua.
- Dejar en reposo aproximadamente 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y dejar reposar de 10 a 15 minutos
- Vaciar a placas petri milimetradas
- Añadir 6-8 gotas de azul de metileno.
- Observar en el microscopio la ausencia o presencia de huevos de Fasciola hepática. En la placa Petri con el objetivo x10 (Chávez J. C.)

3.12.1. Procedimiento para realizar el hallazgo de huevos de Fasciola hepática



Figura 14. Muestra de heces de ovino con solución detergente y tamizando las muestras



Figura 15. Decantado del sobre nadante de las muestras

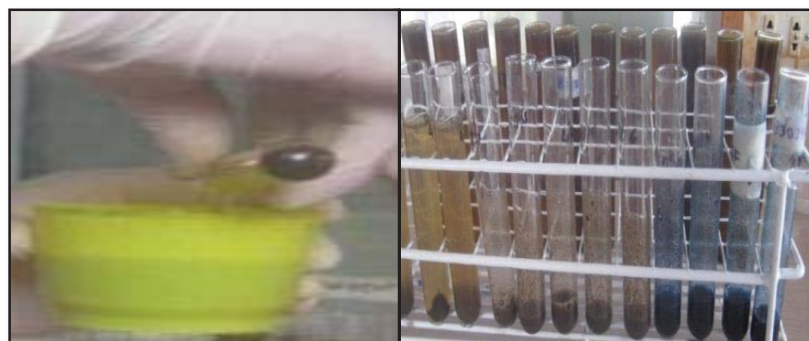


Figura 16. Muestra decantadas con azul de metileno, para observar en el microscopio

3.13. PREVALENCIA

Para determinar la prevalencia de **Fasciola Hepática** en el ganado ovino utilizaremos la siguiente fórmula:

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{\text{Total de animales (ganado ovino) PARASITADOS}}{\text{Total de animales (ganado ovino) MUESTREADOS}} \times 100$$

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultado de densidad óptica de muestreo de suero de ovinos

Al realizar los procedimientos de Elisa Indirecta, las muestras fueron introducidas en lector de micro placas y se obtuvo la siguiente lectura:

Tabla 5. Lectura de Densidad Óptica (DO) proporcionada por el lector de micro placas Elisa (Chromante Manager) de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, placa 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100		58.74466789		64.77757465		99.93906155		75.56368068		104.69226080	
B	3.778184034		40.7678245		53.44302255		76.66057282		30.83485679		75.74649604	
C	28.51919561		17.42839732		30.04265692		37.35527118		36.62400975		54.78366849	
D	24.74101158		22.5472273		30.53016453		26.26447288		40.64594759		45.27726996	
E	20.29250457		42.35222425		33.21145643		32.29737965		23.03473492		45.64290067	
F	32.54113346		26.32541133		24.74101158		29.98171846		26.32541133		19.43936624	
G	40.09750152		7.982937233		32.72394881		34.36928702		32.17550274		19.31748934	
H	4.204753199		14.99085923		33.75990250		36.07556368		46.98354662		42.65691651	

Tabla 6. Lectura de Densidad Óptica (DO) proporcionada por el lector de micro placas Elisa (Chromante Manager) de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, placa 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100		26.97547684	68.80108992	44.89100817	54.22343324	35.55858311					
B	4.08719346	47.34332425	58.85558583	43.80108992	56.94822888	82.97002725						
C	33.92370572	72.47956403	10.08174387	30.38147139	9.264305177	87.05722071						
D	14.44141689	80.79019074	76.15803815	36.17166213	94.41416894	46.59400545						
E	29.08719346	83.71934605	58.24250681	69.48228883	71.9346049	77.04359673						
F	34.40054496	37.12534060	24.93188011	80.51771117	11.17166213	69.34604905						
G	82.42506812	91.96185286	57.83378747	34.40054496	90.59945504	90.25885559						
H	51.08991826	119.8910082	60.96730245	101.2942779	101.1580381	91.21253406						

Tabla 7. Lectura de Densidad Óptica (DO) proporcionada por el lector de micro placas Elisa (Chromante Manager) de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca, placa 3.

	1	2
A	100	
B	3.723404255	
C	43.91252955	
D	30.85106383	
E	33.33333333	
F	20.981087470	
G	36.761229310	

LEYENDA:

0	+/-	+	++	+++
----------	------------	----------	-----------	------------

VAL <10%<= <15%<= <45%<= <75%<= >75

Fuente. (Bio-X Diagnostics S.A.)

0: No presenta ninguna infestación de Fasciola hepática

+/-: Infestación dudoso

+: Infestación leve

++: Infestación moderada

+++: Infestación alta o grave

Tabla 8. Clasificación de los resultados de sueros de referencia positiva y referencia negativa, analizados por Elisa Indirecta.

Inspección Elisa	Infestados I +	No Infestados I -	Dudosos	Total
Total	87	3	4	94

Tabla 9. Prevalencia de la Distomatosis hepática mediante la prueba de Elisa Indirecta en ovinos.

POSITIVOS		NEGATIVOS		DUDOSOS		TOTAL	
N° de animales	%	N° de animales	%	N° de animales	%	N° de animales	%
87.00	92.55	3.00	3.19	4.00	4.26	94.00	100

DISCUSIÓN PARA ELISA INDIRECTA

Como se puede observar en la tabla 9, la prevalencia de la *Fasciola hepática* en ovinos mediante el diagnóstico de Elisa Indirecta fue de 92.55% de positivos, 3.19% de negativo y de 4.26% dudosos de un total de 94 animales.

Torrel Pajares (1997) en Cajamarca con el método de Elisa de Captura en 85 ovinos obtuvo una prevalencia de 90.5%, mis resultados son superiores a obtenidos por Torrel Pajares, esto posiblemente se deba a que en esos años no se utilizaron equipos tan sensibles como en la actualidad.

Casana. WM. (2005) en La Libertad, Pataz con el método de Western Blot en 388 ovinos; encontrándose un número de 214 ovinos presentan una prevalencia de 61.8% estos resultados son inferiores al presente trabajo; esta inferioridad se debe a que el método de Western Blot no es tan específico en detectar anticuerpos.

Soto Olarte. (2011) en Espinar con el método de Elisa Indirecta en 90 vacunos encontró una prevalencia de 91.1%, los cuales son similares a pesar de ser en bovinos, esto quiere decir que este método no especifica especies.

Llanos Yépez. (2013) en Anta con el método de Elisa Indirecta en 95 vacunos encontró una prevalencia de 97.89 para la Distomatosis Hepática este resultado se debe porque la provincia de Anta es una zona endémica para esta enfermedad.

Tabla 10. Prevalencia de la Distomatosis hepática mediante el método coproparasitológico en ovinos

POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL	
N° de Animales	%	N° de animales	%	N° de animales	%
54.00	57.45	40.00	42.55	94.00	100.0

DISCUSIÓN PARA DENNIS MODIFICADO

Como se puede observar en la tabla 10 la prevalencia de la Distomatosis Hepatica en ovinos por el método de Dennis modificado se determinó que 54 muestras de heces de ovinos presentan huevo de *Fasciola hepática*, lo que representa una prevalencia de 57.45% y de 42.5% son negativos a Fasciolosis de un total de 94 ovinos en la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del Distrito de Santo Tomas de la provincia de Chumbivilcas. Torrel Pajares (1997) Matadero – Cajamarca obtuvo una prevalencia de 69.4% que es superior al resultado obtenido en el presente trabajo 57.45% este valor se atribuye que, en su mayoría de territorio, cuenta con acequias y arroyos; además de muchos lugares pantanosos que son lugares preferidos por los pobladores para el pastoreo debido a la gran cantidad de pastos naturales que allí crecen.

Casana WM. (2005) en La Libertad de un total de 388 ovinos se encontró una prevalencia de 42.3% que es inferior a los obtenidos en el presente trabajo 57.45%; esta superioridad se debe a que uno de los factores que influye en esta prevalencia podría ser el poco interés de algunos productores en realizar el tratamiento y el manejo donde frecuentemente los productores pastorean en bofedales y solo en épocas de lluvia en laderas de la comunidad. Barriga NL. (2013) Jorge Basadre Tacna; quien

obtuvo una prevalencia de 25.22% que es inferior al resultado que obtuvimos 57.45%, este resultado obtenido es relativamente alto debido a que en la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca. Existen condiciones ecológicas sumamente adecuadas para el desarrollo del parásito y del caracol. Sin embargo, la temperatura no sería el factor determinante, sino la presencia de humedad permanente proveídos por ríos, bofedales, manantiales, que permite la *Fasciola hepática*. En Tacna la zona no es endémica esto podría deberse que el % de dístoma es muy bajo. Ticona D. (2010) Vilcashuaman-Ayacucho, obtuvo una prevalencia de 39.1% el cual es inferior al resultado obtenido en el presente trabajo de investigación 57.45% este valor se atribuye que en la mayoría los productores de esta comunidad tienen un desconocimiento y despreocupación, si tiene una alta o baja prevalencia de *Fasciola hepática* lo cual puede deberse a la presencia de enfermedades infecciosas o gastrointestinales.

Sangay M. (2013) llevado a cabo en Paríamarca y Cashapampa (Cajamarca), de un total de 384 muestras fecales de ovinos, se encontró una prevalencia de 29% y 27% respectivamente. Estos contrastes posiblemente se deban a las diferencias ambientales que determina la supervivencia del parásito y de su hospedero intermediario. Así como también las diferentes políticas que se aplican con respecto a la dosificación antiparasitaria a los animales y la capacitación a los pequeños ganaderos como también en la zona esta enfermedad se presenta esporádicamente. En el presente trabajo se utilizó una prueba parasitológica; llamada técnica de Dennis modificado. Por lo que se debe contrastar los resultados con una prueba inmunológica. Ya que las pruebas coparásitológicas solo son positivas cuando el parásito está en

el estadio adulto; a diferencia de las pruebas inmunológicas a partir de la identificación de coproantígenos.

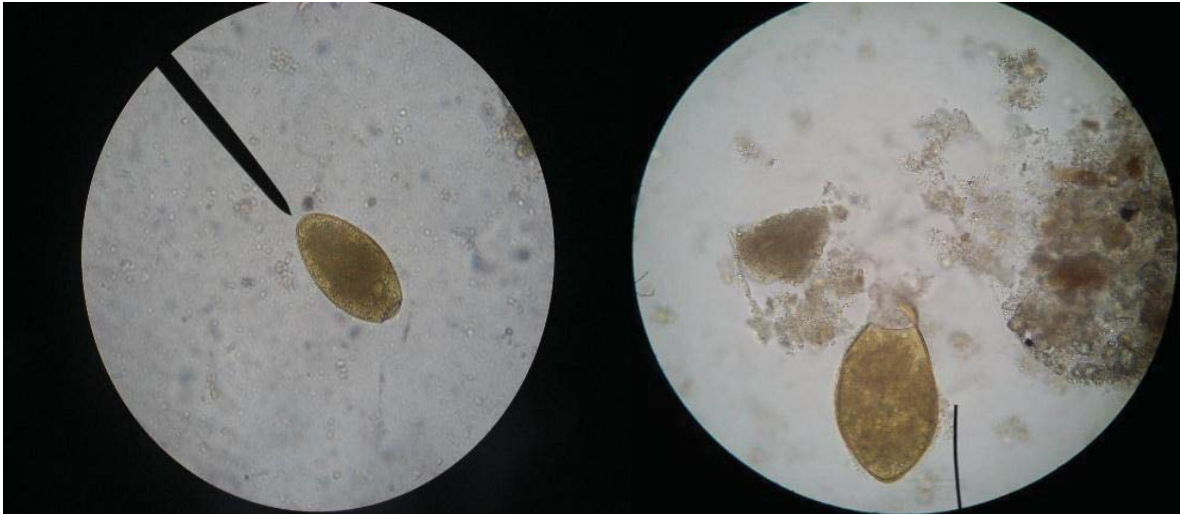


Figura 17. Huevos de fasciola hepática

Tabla 11. Prevalencia Comparativa entre los dos Métodos de Elisa Indirecta y Dennis Modificado

ELISA INDIRECTA			DENNIS MODIFICADO		
N° de animales infectados	% prevalencia	Total de animales	N° de animales infectados	% prevalencia	Total de animales
87.00	92.55	94.00	54.00	57.45	94.00

En la tabla 11 se aprecia que la prevalencia de *Fasciola hepática* para ovinos con Elisa indirecta 92.55% es mayor que la prevalencia al análisis coproscopico 57.45%.

El metodo de Elisa Indirecta es más sensible que Dennis modificado debido a que detecta fases pre patentes ya que los ovinos al ingerir las metacercarias infecciosas estas viajan hasta el hígado para localizarse en los conductos biliares desde donde comenzaran a eliminar los huevos a partir de los 8 a 10 semanas de haber infestado al animal, es en esta etapa que el animal al ser sometido a un examen

coproparasitológico dará un resultado negativo o falso negativo; por otra parte, al realizar el diagnóstico serológico de Elisa indirecta su detección se hace en menos tiempo ya que en el suero se podrán detectar los antígenos de secreción y excreción propios de la *Fasciola hepática*, incluso a los pocos días de su infestación; siendo este un gran aporte para tomar decisiones inmediatas en el tratamiento y control de esta infestación.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se desarrolló el presente trabajo de investigación, se concluye que:

- La prevalencia de Distomatosis hepática mediante la prueba serológica de Elisa Indirecta en la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo Tomas de la Provincia de Chumbivilcas fue de 92.55%, indicando que existe una alta prevalencia de la enfermedad de *fasciola hepática*.
- La prevalencia de Distomatosis hepática mediante el análisis coprológico de Dennis modificado en la Comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo Tomas de la Provincia de Chumbivilcas. Fue de 57.45%, indicando que existe una menor prevalencia que la prueba de Elisa Indirecta; no obstante, con este método se detecta la fase patente de *Faciola hepatica* que se encuentra en los conductos biliares en forma adulta.

Concluyo que el análisis ha demostrado que el hallazgo de antígenos es más eficaz que el hallazgo de huevos del parásito en heces.

5.2. RECOMENDACIONES

- Desparasitación adecuada con dosis recomendado por el producto, 2 veces al año, antes y después del periodo de las lluvias en la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo Tomas de la Provincia de Chumbivilcas.
- Realizar estudios de diagnóstico para parásitos gastrointestinales en ovinos, así como también practicarlo en diferentes áreas y especies animales, con el fin de ampliar los datos que se tienen sobre esta prueba, y de acuerdo a sus conclusiones utilizarla como una prueba de rutina.
- Realizar campañas informativas, prevención, tratamiento, de ovinos dirigidas a los diferentes productores de la comunidad de Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca del distrito de Santo Tomas de la Provincia de Chumbivilcas; ya que ayudara tanto a su crecimiento económico como a mejorar la salud animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas , A. (2002).** *Inmunología celular y molecular* . Editorial McGRAW-Hill-Interamericana.
- Agencia Agraria Santo Tomas. (2012).** Proyecto: Mejoramiento de raza de ovino criollo. *Proyecto: Mejoramiento de razas de ovinos*. Santo Tomas, Chumbivilcas, Cusco: Municipalidad Provincial de Chumbivilcas.
- Alcaíno, A. (1986).** *Algunos antecedentes sobre la fasciolosis animal y humana. monografía medicina veterinaria.*
- Barriga NL. (2013).** *Prevalencia de Fasciolosis en el ganado caprino (Capra aegagrus hircus) y ovino (Ovis orientalis aries) en los humedales del Distrito de Ite, Provincia Jorge Basadre-Tacna 2012*. Tacna: Tesis de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Catolica de Santa Maria.
- Bendezu, D. (1973).** Distomatosis hepática. *Revista Peruana de Biología*.
- Blaha, T. (1995).** *Epidemiología especial veterinaria*. Mexico: Segunda Edición Editorial Acribia.
- Blood Henderson, R. (1986).** *Medicina Veterinaria*. México: 6ª edición. México. Interamericana.
- Blood, D., & Radostit, D. (1992).** *Medicina veterinaria.vol.II septima edicion* . España: Inter americana.
- Boero, J. (1976).** *Parasitología Animal*. Buenos Aires – Argentina.: Editorial Eudeba.
- Boray, J. (1985).** *9. flukes of domestic animals En parasites pests and predators, Gaafar et al editors,Elsevier pub*. España.
- Boray, J. (1997).** *chemotherapy of infection with fasciolidae* . Ed.J.C.boray.

- Boray, J. C. (1981).** *Fascioliasis and other trematode infections. I .En: recent advances in research on fasciola and other trematodes of animals. review of advances in parasitology,w. Slusarski (ed) polonia PWN-Polish scientific publishers. Polonia: w. slusarski.*
- Borchert, A. (1975).** *Parasitología Veterinaria. traducido del alemán por Cordero.* Barcelona – España.: 3ra edición. Barcelona.
- Borchert, A. (1981).** *Parasitología veterinaria .* Zaragoza: Acribia.
- Casana WM. (2005).** *Prevalencia de la infección por Fasciola hepática en Ovis aries y Bos tauros en la Provincia de Pataz.* La Libertad, Perú: Tesis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Chandra, P. (1979).** *métodos de biología molecular.* España: Editorial Acribia Zaragoza España.
- Colona, E. (1995).** *evaluación de antígenos de fasciola hepática por tres métodos inmunológicos.* Región Andrés Avelino Cáceres, Junín.
- Copa , Q. (1999).** *Manual práctico de veterinaria. Universidad Católica Boliviana.* Bolivia.
- Cordero del campillo, M., Rojo, F., Sanchez, C., Hernandez, S., Navarrete, J., & Diaz, P. (1999).** *Parasitología Veterinaria.* Madrid: McGraw-Hill interamericana.
- Cuadros, M. S. (2005).** *Parasitología veterinaria I Universidad Católica de Santa María.* Arequipa-Perú.
- Faiweather, I. (1999).** *Mechanismos of fasciolicide action and drug resistense in fasciola hepática. En fasciolosis. Dalton, J.P.ed. CABI Publishing. .*
- Flores, R., Reyes, L. H., & Guzman, V. D. (2008).** *Ecología y medio ambiente,.* Cengage Learning.
- Garcia, Z. (1990).** *Epidemiología veterinaria y salud animal .* Mexico: Limusa.

- Gorman, T. (1994).** *Inmunodiagnostico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunoenzimatica.* Santiago: Parasitología al día.
- INEI. (10 de 08 de 2010).** Obtenido de <http://map-peru.com/es/mapas/ficha-districto-de-santo-tomas?fbclid=IwAR1Ry566HqeuVvayLH8ib2DcY1WLOnrI44Mf4MjjKVIX7ocqo0JCpQ4w11c>
- INEI. (2012).** *IV Censo nacional agropecuario* . Obtenido de IV Censo nacional agropecuario : www.inei.gob.pe
- Kassai, T. (1998).** *Helmintologia veterinaria (primera edicion).* Zaragoza : Acribia.
- Leguia G. (1988).** *Distomatosis hepática en el Perú. Epidemiologia y Control.* Lima: Ciba Geigy-Hoesh.
- Llanos Yopez, M. J. (2013).** *Prevalencia de la Distomatosis Hepática por el metodo de Elisa Indirecta y Dennis Modificado en ganado Vacuno en los estables del distrito de Zurite de la provincia de Anta del departamento del Cusco.* Anta: Tesis de la carrera profesional de Zootécnia. UNSAAC.
- Malek, E. A. (1985).** *Fasciolosis and its snail hosts. En: Snails host of schistosomiasis and other snail transmitted diseases, E.A Malek (Ed). Washington, tropical americana: A manuel, PAHO.* Washington.
- Manrique, M. C. (2002).** *Fasciolosis: buscando estrategias de control.* Arequipa: Akwarella.
- Manual Merck de Veterinaria. (1984).** *Un manual de diagnóstico y tratamiento, prevención y control de las enfermedades para el veterinario.* Barcelona-España.
- Marcos, L., Terashima, A., Leguia, A., Canales, M., Espinoza, J., & Gotuzzo, E. (2007).** *La infeccion por fasciola hepatica en el peru: una enfermedad emergente* . Peru: Gastroenterol peru 27(4): 389-96.

- Matos, M. J., Ueno, H., Goncalves, P. C., & Almeida, J. E. (1997).** *Seasonal occurrence and bioecology of Lymnaea colunella say, 1817 (mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in rio grande do sul, Brazil revista brasileira de medicina veterinaria.* Brazil.
- Mego, J. (2009).** *La fascioliasis humana y animal, sistema de revisiones en investigacion veterinaria en San Marcos, boletin informativo.* Lima.
- MINAM, & IGP. (1964-1972).** <http://www.met.igp.gob.pe>. Obtenido de <http://www.met.igp.gob.pe>: http://www.met.igp.gob.pe/clima/HTML/santotomas.html?fbclid=IwAR1Qz_PmGVOltjzXLseoxm753c6QJP9xuqoM_hrLB5sD_fF8CEjX9bzjaM
- O'Brien, D. (1998).** *Fasciolosis: a threat to livestock. Irish vet. J.51.*
- Ollenshaw, C. (1971).** *Some observations on the epidemiology of fasciolosis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. The veterinary record.*
- Olsen, O. W. (1997).** *Parasitologia animal (3ra edicion).* Barcelona: Aedos. España.
- Organizacion World Health. (1995).** *Control of foodborne trematode infections. report of a WHO study group Geneva: WHO; WHO teachnical Report series, N°849.*
- Quiroz, H. (1984).** *Parasitologia y enfermedades de los animales domesticos .* Mexico: Limusa.
- Quiroz, H. (2000).** *Parasitologia y enfermedades parasitarias de animales domesticos.* Mexico: Uteha.
- Rojas, C. (1993).** *Parasitismo de los rumiantes domestico. terapia, prevencion y modelos para su aprendizaje.* Lima: Maijosa.
- Rojo, F. A., & Ferre, I. (1999).** *Fasciolosis en cordero M. y Rojo F.A. (eds.) parasitologia veterinaria .* Mdrid: McGraw Hill interamericana.

- Sangay M. (2013).** *Prevalencia de la Fasciolosis y paramphistomosis en ovinos (ovis aries) en los centros poblados de Paríamarca y Cashapampa.* Distrito de Cajamarca: Tesis de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca.
- Soto Olarte, C. R. (2011).** *Prevalencia de la Distomatosis Hepatica por el metodo de Elisa Indirecta y Dennis Modificado en Vacunos, de las comunidades de Paccopata, Hanccollahua, Huisa y Huanohuano Espinar.* Espinar: Tesis de la carrera profesional de Zootécnia. UNSAAC.
- Soulsby, E. J. (1987).** *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domesticos.* Mexico: Interamericana .
- Ticona , D. (1990).** *Prevalencia de la fasciola hepática en ovinos y bovinos de vilcashuaman, Ayacucho” laboratorio de patología clínica, facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor.* San Marcos, Lima.
- Ticona D., Chavez A., Casas G., Chavera A., & Li O. (2010).** Prevalencia de Fasciola hepatica en bovinos y ovinos de Vilcashuaman. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú XXI (2).*
- Torgerson, P., & Claxton, J. (1999).** *Epidemiology and control. En: fasciolosis. J.P. Dalton (eds). London, UK, CABI International.*
- Torrel Pajares, T. (1997).** Deteccion de Coproantigenos de Fasciola Hepática en Ovinos y Bovinos mediante un metodo de Elisa. *Rev Inv Pec IVITA (Perú); 8(1), 74-78.*
- Universidad Complutense de Madrid. (2007).** *Prueba de Elisa.* Madrid: Facultad de Medicina Veterinaria.
- Urquhart, G., & Armour, J. (2001).** *Parasitología veterinaria (2da edicion).* Zaragoza: Acribia.

Viromedica. (23 de Febrero de 2010). *Viromedica*. Obtenido de Viromedica:
<http://viromedica.blogspot.com/2010/02/elisa-enzyme-linked-immunoabsorvent.html>

ANEXOS

Anexo N° 1: Calculo para determinar el tamaño de la muestra

Cálculos para determinar el tamaño de muestra, de la comunidad de Pfullpuri Puente Coyo Uscamarca del distrito de Santo tomas provincia Chumbivilcas.

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

Dónde:

- N:** Tamaño de la población.
Z: 1.96, nivel de confianza que se da a la muestra.
p: Variabilidad 0.5.
q: Variabilidad 0.5.
E: Precisión o error Experimental 0.1% al 90%.
n: Tamaño de muestra.

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

$$n = \frac{3582 (1.96)^2 (0.5) (0.5)}{(3582 - 1) (0.1)^2 + (1.96)^2 (0.5) (0.5)}$$

$$n = \frac{3582(3.8416) (0.25)}{(3581) (0.01) + (3.8416)(0.25)}$$

$$n = \frac{3582(0.9604)}{35.81 + 0.9604} = \frac{3440.1528}{36.7704} = 93.557665948697 = 94$$

Anexo N° 2: Ficha de trabajo en campo – Registro de muestra de sangre y heces

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROPECUARIA
REGISTRO DE MUESTRAS DE SANGRE**

COMUNIDAD: DISTRITO:

PROVINCIA: DEPARTAMENTO:

FECHA:

N°	CODIGO	PROPIETARIO	NOMBRE DEL ANIMAL	EDAD	RAZA
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					

Anexo N° 3: Ficha de trabajo en laboratorio – Registro para la obtención de resultados de la prueba de Elisa

REGISTRO PARA LA OBTENCION DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA

NOMBRE DE PRUEBA..... SECTOR.....

DISTRITO..... PROVINCIADEPARTAMENTO.....

N° DE PLACA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fecha..... Especie.....

Serie/cod.Kit.....

**Anexo N° 4: Toma de muestra de sangre de ovinos en la comunidad
Pfullpuri Puente Ccoyo Uscamarca**



Anexo N° 5: Registro de ovinos para la prueba de Elisa Indirecta y Dennis

Modificado

N°	CODIGO	PROPIETARIO	NOMBRE DEL ANIMAL	EDAD	RAZA
1	1	Pablo Cabrera Muriel.	S/N	BLL	C
2	3	Pablo Cabrera Muriel.	CHUNO	BLL	C
3	5	Pablo Cabrera Muriel.	S/N	BLL	CZ
4	7	Juan Cabrera Chuquirimay	CILA	6D	CN
5	9	Juan Cabrera Chuquirimay	S/N	4D	C
6	11	Juan Cabrera Chuquirimay	BLANCA	6D	C
7	13	Juan Climaco Mendoza	ILLA	6D	CN
8	15	Juan Climaco Mendoza	SUSANA	6D	CN
9	17	Juan Climaco Mendoza	GLORIA	BLL	CN
10	19	Mauro Cabrera Muriel	GORDA	BLL	CN
11	21	Mauro Cabrera Muriel	ILDA	BLL	CN
12	23	Mauro Cabrera Muriel	JUANA	BLL	CN
13	25	Porfirio Checya Flores	S/N	6D	C
14	27	Porfirio Checya Flores	S/N	4D	C
15	29	Porfirio Checya Flores	S/N	BLL	C
16	31	Maximo Cabrera	S/N	BLL	CZ
17	33	Maximo Cabrera	ELISA	6D	CZ
18	35	Victor Monterola Patiño	TOMASA	6D	CN
19	37	Victor Monterola Patiño	PEQUEÑA	4D	CN
20	39	Victor Monterola Patiño	AVICHA	BLL	CN
21	41	Estanislao Gomez	S/N	BLL	CZ
22	43	Estanislao Gomez	S/N	BLL	CZ
23	45	Estanislao Gomez	S/N	BLL	CZ
24	47	Ignacio Huamani Valencia	SANTA	4D	CN
25	49	Ignacio Huamani Valencia	CLEOPATRA	6D	CN
26	51	Ignacio Huamani Valencia	NIÑA	BLL	CN
27	53	Teodoro Bautista	S/N	BLL	C
28	55	Teodoro Bautista	S/N	BLL	C
29	57	Teodoro Bautista	S/N	BLL	C
30	59	Mario Mendoza Merma	SALVAJE	6D	CZ
31	61	Mario Mendoza Merma	MALVADA	6D	CZ
32	63	Mario Mendoza Merma	ISABEL	6D	CZ
33	65	Juan Esquivel Peña	S/N	BLL	C

34	67	Juan Esquivel Peña	S/N	BLL	C
35	69	Juan Esquivel Peña	S/N	BLL	C
36	71	Luisa Pineda Guevara	DACHIS	4D	CN
37	73	Luisa Pineda Guevara	SURI	4D	CN
38	75	Luisa Pineda Guevara	FARIZA	4D	CN
39	77	Miguel Heredia	S/N	BLL	CZ
40	79	Miguel Heredia	S/N	BLL	CZ
41	81	Miguel Heredia	S/N	BLL	CZ
42	83	Zaragoza Cuba Vera	PEPE	4D	CN
43	85	Zaragoza Cuba Vera	BANDIDO	4D	CN
44	87	Zaragoza Cuba Vera	CAZADOR	4D	CN
45	89	Daniel Centeno Diaz	S/N	BLL	C
46	91	Daniel Centeno Diaz	S/N	BLL	C
47	93	Daniel Centeno Diaz	S/N	BLL	C
48	95	Cesar Calluche Mendoza	PACHAMAMA	6D	CZ
49	97	Cesar Calluche Mendoza	ANY	BLL	CZ
50	99	Cesar Calluche Mendoza	LUZCA	6D	CZ
51	101	Aurora Narvaez Almora	S/N	BLL	C
52	103	Aurora Narvaez Almora	S/N	BLL	C
53	105	Aurora Narvaez Almora	S/N	BLL	C
54	107	Josue Alferez Mendoza	FORAJIDA	4D	CN
55	109	Josue Alferez Mendoza	CANTUTA	6D	CN
56	111	Josue Alferez Mendoza	LILI	BLL	CN
57	113	Mariano Ancalla Merma	S/N	BLL	CZ
58	115	Mariano Ancalla Merma	S/N	6D	CZ
59	117	Mariano Ancalla Merma	S/N	4D	CZ
60	119	Remigio Salcedo Ibarra	URPHY I	BLL	CN
61	121	Remigio Salcedo Ibarra	URPHY II	BLL	CN
62	123	Remigio Salcedo Ibarra	GLISELDA	6D	CN
63	125	Ignacio Layme Checya	S/N	4D	CZ
64	127	Ignacio Layme Checya	S/N	BLL	CZ
65	129	Ignacio Layme Checya	S/N	6D	CZ
66	131	Bernave Ancalla Huayto	S/N	BLL	C
67	133	Bernave Ancalla Huayto	S/N	4D	C
68	135	Bernave Ancalla Huayto	S/N	6D	C
69	137	Sixto Herrera Valencia	FLORENCIA	BLL	CN
70	139	Sixto Herrera Valencia	CUSQUEÑA	BLL	CN
71	141	Sixto Herrera Valencia	PANDORA	BLL	CN

72	143	Nolberto Quispe Layme	S/N	BLL	C
73	145	Nolberto Quispe Layme	S/N	BLL	C
74	147	Nolberto Quispe Layme	S/N	6D	C
75	149	Felipa Herrera Valencia	HILDAURA	BLL	CN
76	151	Felipa Herrera Valencia	LISBETH	BLL	CN
77	153	Felipa Herrera Valencia	VALENTINA	BLL	CN
78	155	Casemiro Checya Patiño	S/N	BLL	CZ
79	157	Casemiro Checya Patiño	S/N	6D	CZ
80	159	Casemiro Checya Patiño	S/N	6D	CZ
81	161	Aquilino Ccalluche Tribeño	S/N	BLL	CZ
82	163	Aquilino Ccalluche Tribeño	S/N	4D	CZ
83	165	Aquilino Ccalluche Tribeño	S/N	BLL	CZ
84	167	Espiritu Soncco Salhua	S/N	BLL	C
85	169	Espiritu Soncco Salhua	S/N	6D	C
86	171	Espiritu Soncco Salhua	S/N	6D	C
87	173	Rosalon Corrales	NEGRO I	4D	CZ
88	175	Rosalon Corrales	NEGRO II	BLL	CZ
89	177	Lucho Quispe	SOLEDAD I	BLL	C
90	179	Lucho Quispe	SOLEDAD II	6D	C
91	181	Lucho Quispe	JONAS	BLL	C
92	183	Francisco Montañez Muriel	CHAVAL	BLL	CN
93	185	Francisco Montañez Muriel	CHAPARRO	BLL	CN
94	187	Francisco Montañez Muriel	MILUSCA	BLL	CN

Anexo N° 6: Calculo para determinar la prevalencia de la Distomatosis Hepática

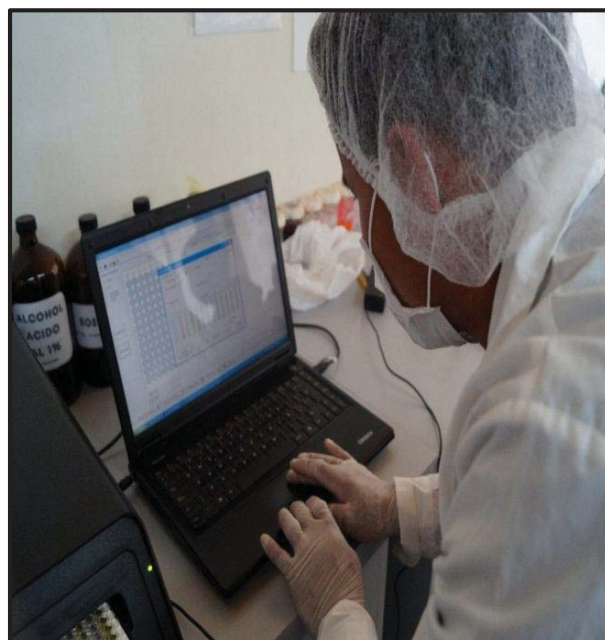
Cálculos para determinar la prevalencia de la Distomatosis Hepática de ELISA INDIRECTA y DENNIS MODIFICADO. en ovinos de la comunidad de Pfullpuri Puente Coyo Uscamarca del distrito de Santo tomas provincia Chumbivilcas.

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{\text{Total de animales (ganado ovino) PARASITADOS}}{\text{Total de animales (ganado ovino) MUESTREADOS}} \times 100$$

Anexo N° 7: Crioviales con suero y descongelamiento antes de ser procesados en la prueba de Elisa indirecta



Anexo N° 8: Resultados finales en la lectura de densidad óptica, por el método de lector de microplacas



Anexo N° 9: Resultados de la densidad óptica diagnóstico de la Distomatosis Hepática y del Análisis Coproparasitológico

N°	CODIGO	PROPIETARIO	NOMBRE DEL ANIMAL	EDAD	RAZA	DE. OP	DENSIDAD OPTICA CORREGIDA	NIVEL DE INFESTACION	DIAGNOSTICO POR ELISA	N° DE HUEVOS/GRAMOS DE HESES	DIAGNOSTICO COPROLOGICO
1	1	PABLO CABRERA MURIEL.	S/N	BLL	C	0.344	24.74101158	x	Positivo	00	Negativo
2	3	PABLO CABRERA MURIEL.	CHUNO	BLL	C	0.271	20.29250457	x	Positivo	00	Negativo
3	5	PABLO CABRERA MURIEL.	S/N	BLL	CZ	0.472	32.54113346	x	Positivo	02	Positivo
4	7	JUAN CABRERA CHUQUIRIMAY	CILA	4D	CN	0.596	40.09750152	x	Positivo	00	Negativo
5	9	JUAN CABRERA CHUQUIRIMAY	S/N	4D	C	0.007	4.204753199	-	negativo	06	positivo
6	11	JUAN CABRERA CHUQUIRIMAY	BLANCA	4D	C	0.902	58.744466789	xx	Positivo	04	positivo
7	13	JUAN CLIMACO MENDOZA	ILLA	6D	CN	0.607	40.7678245	x	Positivo	01	positivo
8	15	JUAN CLIMACO MENDOZA	SUSANA	4D	CN	0.224	17.42839732	x	Positivo	00	Negativo
9	17	JUAN CLIMACO MENDOZA	GLORIA	BLL	CN	0.308	22.5472273	x	Positivo	00	Negativo
10	19	MAURO CABRERA MURIEL	GORDA	BLL	CN	0.633	42.35222425	x	Positivo	03	positivo
11	21	MAURO CABRERA MURIEL	ILDA	BLL	CN	0.37	26.32541133	x	Positivo	00	Negativo
12	23	MAURO CABRERA MURIEL	JUANA	BLL	CN	0.069	7.982937233	-	negativo	00	Negativo
13	25	PORFIRIO CHECYA FLORES	S/N	4D	C	0.184	14.99085923	+/-	dudoso	01	positivo

14	27	PORFIRIO CHECYA FLORES	S/N	4D	C	1.001	64.77757465	xx	Positivo	00	Negativo
15	29	PORFIRIO CHECYA FLORES	S/N	BLL	C	0.815	53.44302255	xx	Positivo	00	Negativo
16	31	MAXIMO CABRERA	S/N	BLL	CZ	0.431	30.04265692	x	Positivo	03	positivo
17	33	MAXIMO CABRERA	ELISA	4D	CZ	0.439	30.53016453	x	Positivo	00	Negativo
18	35	VICTOR MONTEROLA PATIÑO	TOMASA	6D	CN	0.483	33.21145643	x	Positivo	00	Negativo
19	37	VICTOR MONTEROLA PATIÑO	PEQUEÑA	4D	CN	0.344	24.74101158	x	Positivo	01	Positivo
20	39	VICTOR MONTEROLA PATIÑO	AVICHA	BLL	CN	0.475	32.72394881	x	Positivo	00	Negativo
21	41	ESTANISLAO GOMEZ	S/N	BLL	CZ	0.492	33.7599025	x	Positivo	00	Negativo
22	43	ESTANISLAO GOMEZ	S/N	BLL	CZ	1.578	99.93906155	xxx	Positivo	01	Positivo
23	45	ESTANISLAO GOMEZ	S/N	BLL	CZ	1.196	76.66057282	xxx	Positivo	00	Negativo
24	47	IGNACIO HUAMANI VALENCIA	SANTA	4D	CN	0.551	37.35527118	x	Positivo	02	Positivo
25	49	IGNACIO HUAMANI VALENCIA	CLEOPATRA	6D	CN	0.369	26.26447288	x	Positivo	00	Negativo
26	51	IGNACIO HUAMANI VALENCIA	NIÑA	BLL	CN	0.468	32.29737965	x	Positivo	00	Negativo
27	53	TEODORO BAUTISTA	S/N	BLL	C	0.43	29.98171846	x	Positivo	02	Positivo
28	55	TEODORO BAUTISTA	S/N	BLL	C	0.502	34.36928702	x	Positivo	01	Positivo
29	57	TEODORO BAUTISTA	S/N	BLL	C	0.53	36.07556368	x	Positivo	19	positivo
30	59	MARIO MENDOZA MERMA	SALVAJE	6D	CZ	1.178	75.56368068	xxx	Positivo	04	Positivo
31	61	MARIO MENDOZA MERMA	MALVADA	6D	CZ	0.444	30.83485679	x	Positivo	03	Positivo
32	63	MARIO MENDOZA MERMA	ISABEL	6D	CZ	0.539	36.62400975	x	Positivo	00	Negativo
33	65	JUAN ESQUIVEL PEÑA	S/N	BLL	C	0.605	40.64594759	x	Positivo	02	Positivo
34	67	JUAN ESQUIVEL PEÑA	S/N	BLL	C	0.316	23.03473492	x	Positivo	03	Positivo
35	69	JUAN ESQUIVEL PEÑA	S/N	BLL	C	0.37	26.32541133	x	Positivo	03	Negativo
36	71	LUISA PINEDA GUEVARA	DACHIS	4D	CN	0.466	32.17550274	x	Positivo	00	Negativo

37	73	LUISA PINEDA GUEVARA	SURI	4D	CN	0.709	46.98354662	xx	Positivo	01	positivo
38	75	LUISA PINEDA GUEVARA	FARIZA	4D	CN	1.656	104.6922608	xxx	Positivo	02	Positivo
39	77	MIGUEL HEREDIA	S/N	BLL	CZ	1.181	75.74649604	xxx	Positivo	00	Negativo
40	79	MIGUEL HEREDIA	S/N	BLL	CZ	0.837	54.78366849	xx	Positivo	00	negativo
41	81	MIGUEL HEREDIA	S/N	BLL	CZ	0.681	45.27726996	xx	Positivo	01	Positivo
42	83	ZARAGOZA CUBA VERA	PEPE	4D	CN	0.687	45.64290067	xx	Positivo	00	Negativo
43	85	ZARAGOZA CUBA VERA	BANDIDO	4D	CN	0.257	19.43936624	x	Positivo	00	Negativo
44	87	ZARAGOZA CUBA VERA	CAZADOR	4D	CN	0.255	19.31748934	x	Positivo	02	Positivo
45	89	DANIEL CENTENO DIAZ	S/N	BLL	C	0.638	42.65691651	x	Positivo	02	Positivo
46	91	DANIEL CENTENO DIAZ	S/N	BLL	C	0.152	14.44141689	+/-	dudoso	00	negativo
47	93	DANIEL CENTENO DIAZ	S/N	BLL	C	0.367	29.08719346	x	Positivo	00	Negativo
48	95	CESAR CALLUCHE MENDOZA	PACHAMAM A	6D	CZ	0.445	34.40054496	x	Positivo	02	Positivo
49	97	CESAR CALLUCHE MENDOZA	ANY	BLL	CZ	1.15	82.42506812	xxx	Positivo	00	Negativo
50	99	CESAR CALLUCHE MENDOZA	LUZCA	6D	CZ	0.69	51.08991826	xx	Positivo	12	Positivo
51	101	AURORA NARVAEZ ALMORA	S/N	BLL	C	0.336	26.97547684	x	Positivo	01	Positivo
52	103	AURORA NARVAEZ ALMORA	S/N	BLL	C	0.635	47.34332425	xx	Positivo	00	Negativo
53	105	AURORA NARVAEZ ALMORA	S/N	BLL	C	1.004	72.47956403	xx	Positivo	00	Negativo
54	107	JOSUE ALFEREZ MENDOZA	FORAJIDA	4D	CN	1.126	80.79019074	xxx	Positivo	02	positivo
55	109	JOSUE ALFEREZ MENDOZA	CANTUTA	6D	CN	1.169	83.71934605	xxx	Positivo	00	Negativo
56	111	JOSUE ALFEREZ MENDOZA	LILI	BLL	CN	0.485	37.1253406	x	Positivo	00	Negativo
57	113	MARIANO ANGALLA MERMA	S/N	BLL	CZ	1.29	91.96185286	xxx	Positivo	03	Positivo
58	115	MARIANO ANGALLA MERMA	S/N	6D	CZ	1.7	119.8910082	xxx	Positivo	00	Negativo

59	117	MARIANO ANCALLA MERMA	S/N	4D	CZ	0.95	68.80108992	xx	Positivo	10	Positivo
60	119	REMIGIO SALCEDO IBARRA	URPHY I	BLL	CN	0.804	58.85558583	xx	Positivo	22	Positivo
61	121	REMIGIO SALCEDO IBARRA	URPHY II	BLL	CN	0.088	10.08174387	+/-	dudoso	01	positivo
62	123	REMIGIO SALCEDO IBARRA	GLISELDA	6D	CN	1.058	76.15803815	xxx	Positivo	09	Positivo
63	125	IGNACIO LAYME CHECYA	S/N	4D	CZ	0.795	58.24250681	xx	Positivo	04	Positivo
64	127	IGNACIO LAYME CHECYA	S/N	BLL	CZ	0.306	24.93188011	x	Positivo	06	Positivo
65	129	IGNACIO LAYME CHECYA	S/N	6D	CZ	0.789	57.83378747	xx	Positivo	05	positivo
66	131	BERNAVE ANCALLA HUAYTO	S/N	BLL	C	0.835	60.96730245	xx	Positivo	00	Negativo
67	133	BERNAVE ANCALLA HUAYTO	S/N	4D	C	0.599	44.89100817	xx	Positivo	00	Negativo
68	135	BERNAVE ANCALLA HUAYTO	S/N	6D	C	0.583	43.80108992	x	Positivo	00	Negativo
69	137	SIXTO HERRERA VALENCIA	FLORENCIA	BLL	CN	0.386	30.38147139	x	Positivo	00	Negativo
70	139	SIXTO HERRERA VALENCIA	CUSQUEÑA	BLL	CN	0.471	36.17166213	x	Positivo	08	Positivo
71	141	SIXTO HERRERA VALENCIA	PANDORA	BLL	CN	0.96	69.48228883	xx	Positivo	00	Negativo
72	143	NOLBERTO QUISPE LAYME	S/N	BLL	C	1.122	80.51771117	xxx	Positivo	01	Positivo
73	145	NOLBERTO QUISPE LAYME	S/N	BLL	C	0.445	34.40054496	x	Positivo	00	Negativo
74	147	NOLBERTO QUISPE LAYME	S/N	6D	C	1.427	101.2942779	xxx	Positivo	01	Positivo
75	149	FELIPA HERRERA VALENCIA	HILDAURA	BLL	CN	0.736	54.22343324	xx	Positivo	11	Positivo
76	151	FELIPA HERRERA VALENCIA	LISBETH	BLL	CN	0.776	56.94822888	xx	Positivo	06	Positivo

77	153	FELIPA HERRERA VALENCIA	VALENTINA	BLL	CN	0.076	9.264305177	-	negativo	01	Positivo
78	155	CASEMIRO CHECYA PATIÑO	S/N	BLL	CZ	1.326	94.41416894	xxx	Positivo	05	Positivo
79	157	CASEMIRO CHECYA PATIÑO	S/N	6D	CZ	0.996	71.9346049	xx	Positivo	00	Positivo
80	159	CASEMIRO CHECYA PATIÑO	S/N	6D	CZ	0.104	11.17166213	+/-	dudoso	02	Positivo
81	161	AQUILINO CCALLUCHE TRIBEÑO	S/N	BLL	CZ	1.27	90.59945504	xxx	Positivo	03	Positivo
82	163	AQUILINO CCALLUCHE TRIBEÑO	S/N	4D	CZ	1.425	101.1580381	xxx	Positivo	07	Positivo
83	165	AQUILINO CCALLUCHE TRIBEÑO	S/N	BLL	CZ	0.462	35.55858311	x	Positivo	01	Positivo
84	167	ESPIRITU SONCCO SALHUA	S/N	BLL	C	1.158	82.97002725	xxx	Positivo	03	Positivo
85	169	ESPIRITU SONCCO SALHUA	S/N	6D	C	1.218	87.05722071	xxx	Positivo	05	Positivo
86	171	ESPIRITU SONCCO SALHUA	S/N	6D	C	0.624	46.59400545	xx	Positivo	16	Positivo
87	173	ROSALON CORRALES	NEGRO I	4D	CZ	1.071	77.04359673	xxx	Positivo	06	Positivo
88	175	ROSALON CORRALES	NEGRO II	BLL	CZ	0.958	69.34604905	xx	Positivo	00	Negativo
89	177	LUCHO QUISPE	SOLEDAD I	BLL	C	1.265	90.25885559	xxx	Positivo	03	Positivo
90	179	LUCHO QUISPE	SOLEDAD II	6D	C	1.279	91.21253406	xxx	positivo	00	Negativo
91	181	LUCHO QUISPE	JONAS	BLL	C	0.459	30.85106383	x	Positivo	04	Positivo
92	183	FRANCISCO MONTAÑEZ MURIEL	CHAVAL	BLL	CN	0.501	33.333333333	x	Positivo	00	Negativo
93	185	FRANCISCO MONTAÑEZ MURIEL	CHAPARRO	BLL	CN	0.292	20.98108747	x	Positivo	30	Positivo
94	187	FRANCISCO MONTAÑEZ MURIEL	MILUSCA	BLL	CN	0.559	36.76122931	x	Positivo	02	Positivo