

DIG-ELISA: Estandarización y evaluación serodiagnóstica en fasciolosis bovina experimental y natural

Froylán Ibarra Velarde*
Natividad Montenegro Cristino**
Yolanda Vera Montenegro*
Chantal Boulard***
Héctor Quiroz Romero**
Carlos Ramón Bautista Garfías*
Carlos Vázquez Pelaez

Resumen

Los objetivos del presente estudio fueron: Determinar la sensibilidad y especificidad de DIG-ELISA y establecer el valor de corte para realizar diagnóstico de fasciolosis bovina; determinar la capacidad diagnóstica de la prueba en bovinos infectados en forma experimental; valorar la seroprevalencia bimensual y durante un año de los títulos IgG anti-*Fasciola hepatica* en sueros de bovinos infectados en forma natural; y comparar la variación con la presencia de huevos del trematodo identificados en el análisis coproparasitológico. Con el propósito de estandarizar la prueba, además de las correspondientes titulaciones de sueros, antígeno y conjugado, se utilizaron 80 sueros de bovinos, de estos últimos 40 pertenecían a animales provenientes del estado de Sonora (zona libre de fasciolosis) y 40 del estado de Hidalgo (zona enzoótica de fasciolosis). La prueba mostró una sensibilidad de 97.5% y una especificidad de 80.0%, obteniendo un valor de corte de 7 mm. En otro estudio, se infectaron 15 bovinos jóvenes de sexo indistinto, cada uno con 600 metacercarias de *Fasciola hepatica*. Los animales fueron sangrados semanalmente y durante 14 ocasiones para obtención de suero. La prueba fue capaz de detectar anticuerpos anti-*F. hepatica* desde la segunda semana posinfección, logrando sus mayores incrementos expresados en diámetro de la zona de reacción (DZR) entre la séptima y décima semanas. En otro experimento se utilizaron 85 bovinos criollos, hembras, de un

rancho ubicado en un área enzoótica de fasciolosis en Nautla, Veracruz, en donde se colectó sangre para obtención de suero, así como heces de cada uno de los bovinos. Los animales fueron muestreados bimensualmente y durante un año para correr los sueros con DIG-ELISA y las heces para realizar análisis por sedimentación. Los porcentajes de seroprevalencia fueron del 58%, 73%, 80%, 100%, 96% y 79% para los meses de marzo, mayo, julio, septiembre, enero y marzo, respectivamente, mostrando porcentajes de positividad similares a aquellos obtenidos en el análisis coproparasitológico ($P > 0.01$). Se concluye que DIG-ELISA mostró alta sensibilidad y fácil montaje para utilizarse bajo condiciones de campo en el diagnóstico temprano de fasciolosis bovina, generando resultados reproducibles que pueden ser de gran utilidad para estudios seroepidemiológicos.

Introducción

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria debida a la acción de *Fasciola hepatica*, trematodo que se localiza en el parénquima hepático de muchos animales domésticos y silvestres, así como ocasionalmente en el hombre. Su relevancia radica en cuantiosas pérdidas económicas que produce^{9,19} y esto puede deberse en parte a la falta de un diagnóstico temprano y adecuado que permita establecer una mejor estrategia para su control.

Por otro lado, el inmunodiagnóstico permite detectar la presencia de anticuerpos utilizando antígenos del parásito completo homogeneizado de diversos estados larvarios y productos de secreción y excreción,¹⁸ de ahí que en las últimas décadas se han instrumentado diversas metodologías para diagnosticar fasciolosis hepática, tales como: Difusión doble en Agar,⁵ intradermorreacción,⁴ contrainmunolectroforesis,¹⁴ métodos de inmunoprecipitación,¹⁵ inmunofluorescencia indirecta y doble difusión en gel,¹⁶ hemaglutinación pasiva e inmunoensayo en capa delgada,¹ entre otras.

Asimismo, el diagnóstico inmunológico de la fasciolosis del ganado se ha realizado utilizando la prueba del inmunoensayo enzimático, mejor conocida como ELISA,⁶⁻¹⁵ la cual ha sido probada en ganado infectado experimentalmente

Recibido para su publicación el 27 de agosto de 1996.
Estudio financiado por la Comisión de Comunidades Europeas,
Programa STD-III Contrato TS3 CT92-0106.

*Proyecto Fasciolosis. CENID-Parasitología/INIFAP/SAGAR. Km 11.5, Carretera Cuernavaca-Cuautla, 62500. Morelos, México.

** Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

*** Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie. Institut National de la Recherche Agronomique, INRA. Centre de Tours. Nouzilly, 37380, France.

Departamento de Genética y Estadística. CENID-Macrobiología/INIFAP/SAGAR. Km 15.5, Carretera México-Toluca, 05110, México, D.F.

y con infección natural.^{7,11,12,15,20,22,23} Sin embargo, esta prueba no facilita su utilización a nivel de campo, por lo que se requiere una técnica que además de mostrar alta sensibilidad y especificidad sea fácil de usar en laboratorios medianamente equipados.

Bautista-Garfias *et al.*² y Fernández *et al.*¹³ evaluaron la técnica de DIG-ELISA en sueros de ovinos y bovinos, respectivamente, señalando que la prueba muestra facilidad de montaje y que podría ser de gran utilidad en el diagnóstico de fasciolosis.

Los objetivos del presente estudio fueron: Determinar la sensibilidad y especificidad de DIG-ELISA y establecer el valor de corte, para realizar diagnóstico de fasciolosis bovina; determinar la capacidad diagnóstica de la prueba en bovinos infectados en forma experimental; valorar la seroprevalencia bimensual y durante un año de los títulos IgG anti-*Fasciola hepatica* en sueros de bovinos infectados en forma natural; y comparar la variación con la presencia de huevos del trematodo identificados en el análisis coproparasitoscópico.

Material y métodos

Localización del estudio

La fase de estandarización de la técnica, así como análisis de sueros y materia fecal, se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Jiutepec, Morelos. El estudio con bovinos infectados en forma experimental se realizó en el Centro de Investigaciones Pecuarias de Hueytamalco, Puebla (CIPEP) del INIFAP, y el experimento sobre evaluación serodiagnóstica de fasciolosis en bovinos con infección natural, se realizó en el rancho "Las Gaviotas" de Nautla, Veracruz.

Preparación del antígeno

Se obtuvo un antígeno de excreciones/secresiones a partir de la incubación de aproximadamente 350 fasciolas colectadas del hígado de bovinos sacrificados en el rastro. Los parásitos fueron lavados en tres ocasiones con solución de Hedon Fleig; y posteriormente se incubaron en 200 ml de esta misma solución a 37°C durante 4 horas. Los parásitos fueron removidos y el material insoluble fue centrifugado a 12000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante fue enviado para su correspondiente congelación a -70°C. El contenido de proteína fue estimado utilizando un espectrómetro.*

Estandarización de DIG-ELISA

Con el fin de instrumentar esta técnica en bovinos, inicialmente se partió de aquel método descrito para ovinos² con varias modificaciones; sin embargo, la técnica

estandarizada es: 1. Se utilizan cajas de Petri de plástico estériles desechables de 100 x 15 mm. Se les agrega 15 ml/caja de etanol al 70%/5 min, se extrae el alcohol y se deja secar al aire. 2. Se sensibilizan las placas, añadiendo a cada placa la concentración necesaria de antígeno diluido en solución salina fisiológica al 0.85% a razón de 2.5 microgramos por ml y se incuban durante 60 minutos a 37°C. Transcurrido este periodo, las cajas se lavan 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos (SAF) con 0.1% de Tween 20. 3. A cada caja se le agregan 15 ml de agar noble al 1 % con leche descremada al 1 % en solución de NaCl 0.15 M, se deja gelificar por 10 minutos y se procede a horadar pozos de 3 mm de diámetro, los pozos se llenan con 10 µl de sueros positivos y negativos diluidos 1:5 en PBS-Tween y se incuban durante 3 h a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se retira el agar y se lavan las cajas como se mencionó anteriormente. 4. Se añaden 10 ml del conjugado IgG anti-bovino, desarrollado en conejo diluido 1:2000 en SAF pH 7.2, después de una hora de incubación a 37°C se lavan tres veces las cajas. 5. Para comparar la visualización de la reacción coloreada se emplea ortho-phenyldiamine dihidroclorhído (OPD),** a razón de 0.4 mg/ml y peróxido de hidrógeno al 30% a razón de 0.4 microlitros por ml en ácido cítrico pH 5. Se diluye agarosa en ácido cítrico y se mantiene a aproximadamente 40°C durante cinco minutos. Se agrega uno a otro sustrato a razón de 12 ml por caja. Después de 20 minutos, los diámetros de las áreas coloreadas se miden con una regla, considerando positivos aquellos sueros en que el DZR rebasa el valor medio de los sueros negativos más una desviación estándar.

Para calcular la sensibilidad, especificidad y valor de corte de la prueba,²¹ se utilizaron 80 sueros de bovinos, 40 provenientes del Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora (CIPES), área libre de fasciolosis, y 40 sueros de un rancho de Tulancingo, Hidalgo, área enzootica de fasciolosis, considerando como base la identificación de huevos de *Fasciola* en el análisis coproparasitoscópico.

Se realizaron los correspondientes ajustes en tiempo en diversos parámetros, a manera de que la prueba pudiera ser evaluada entre 7 y 8 horas.

Serodiagnóstico de *F. hepatica* en bovinos infectados experimentalmente

Producción de metacercarias. Se produjeron metacercarias de *F. hepatica* en el laboratorio, a partir de la infección de caracoles *Lymnaea spp* con miracidios de origen bovino.

Bovinos. Para realizar la infección con *F. hepatica*, se utilizaron 15 bovinos jóvenes encastados de razas europeas con Cebú de entre 8 y 12 meses de edad, de sexo indistinto, los cuales fueron infectados cada uno con 600 metacercarias del parásito, administradas en una cápsula de gelatina. *Obtención de suero.* Cada semana y durante 14 ocasiones, los animales en experimentación fueron sangrados en la vena coccígea, utilizando el sistema Vacutainer. El suero fue separado por centrifugación y almacenado en viales, los cuales fueron transportados en hielo al laboratorio para ser congelados a -20° C, hasta su utilización.

* Baush and Lomb, mod. Spectronic 21.

**Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, Mo., USA.

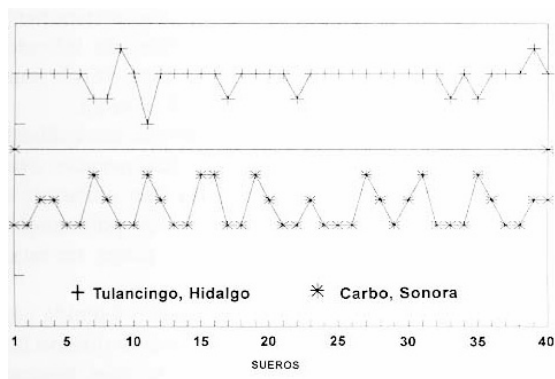
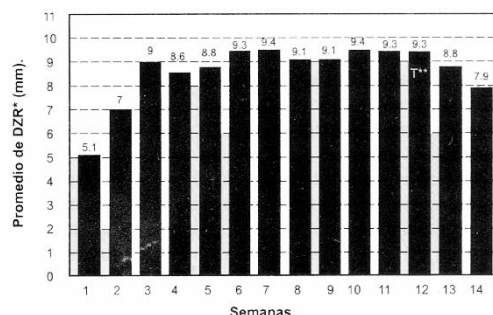


Fig. 1. Determinación del punto de corte para DIG-ELISA en bovinos.



* Diámetro de la Zona de Reacción (sueros > 7 mm fueron considerados como positivos)
 ** Tratamiento con triclabendazol
 n = 15 animales infectados cada uno con 800 metacercarias de *Fasciola hepatica*

Fig. 2. Diagnóstico de fasciolosis mediante DIG-ELISA en bovinos infectados en forma experimental.

Análisis serológico. Los sueros obtenidos se analizaron utilizando DIG-ELISA modificada para bovinos.

Serodiagnóstico de *F. hepatica* en bovinos infectados en forma natural

Se usaron 85 bovinos criollos, hembras adultas, pertenecientes al rancho "Las Gaviotas" de Nautla, Veracruz. De manera similar al experimento anterior, los bovinos fueron sangrados para obtención de suero. La colecta de muestras se llevó a cabo bimensualmente desde marzo de 1995 a marzo de 1996, con excepción del mes de noviembre debido a que las condiciones climáticas "nortes" no permitieron realizar el muestreo en ese mes. Los sueros fueron sometidos al correspondiente análisis mediante DIG-ELISA.

Análisis coproparasitológico. A los bovinos en estudio también se les tomó una muestra de heces que fue analizada en el laboratorio mediante una sedimentación cuantitativa.³

Análisis estadístico. La información obtenida en cada experimento fue sometida a un análisis de varianza utilizando un modelo lineal en el cual se compararon variables de la prueba intraensayo, entre sueros y entre ranchos. Los datos obtenidos con los sueros referente al parámetro sobre diámetro de la zona de reacción, fueron sometidos a una prueba de "t" de Student, utilizando el método descrito por Burr-Foster.⁸

Resultados

Estandarización de la prueba

Los parámetros obtenidos fueron los siguientes: Antígeno 15 ml/caja de Petri, incubación 1 hora; agar al 1 % 15 ml/ caja de Petri, dilución de suero 1:5, incubación 3 horas a 37°C; sustrato 0.4 pg/ml en agarosa al .75%.

Los títulos de anticuerpos expresados en DZR para los sueros negativos (Sonora) y positivos (Hidalgo), oscilaron entre 3 y 5 mm (± 4.6) y 8 y 11 mm (± 9.8), respectivamente. La prueba mostró tener una sensibilidad de 97.5% y una especificidad del 80.0%, determinando un punto de corte 7 mm, \pm una desviación estándar (Figura 1).

El análisis estadístico indicó que no hubo diferencias intraensayo, ni entre los sueros provenientes de una misma zona ($P > 0.01$). Sin embargo, si se observó significancia entre ranchos y entre los sueros diagnosticados como positivos y negativos ($P < 0.01$).

Serodiagnóstico de bovinos infectados experimentalmente

La Figura 2 muestra los valores promedio del DZR obtenidos con los sueros de los bovinos infectados en forma experimental. En la segunda semana posterior a la infección con metacercarias de *F. hepatica*, 10 de 15 bovinos (66.6%) fueron detectados como positivos a anticuerpos anti-IgG del parásito y en la tercera semana posinfección, DIG-ELISA pudo diagnosticar al 100% de bovinos como positivos. Los máximos valores de positividad oscilaron entre la semana 7 a la 10, manteniéndose altos los niveles de anticuerpos hasta la semana 12. En esta última semana, los bovinos fueron desparasitados con triclabendazol* por lo que en las semanas 13 y 14 se observó un decline en la seropositividad de las muestras. Por razones ajenas los bovinos fueron enviados al sacrificio y, por ende, no fue posible determinar el tiempo en que los animales ya desparasitados volvían a ser seronegativos a *F. hepatica*.

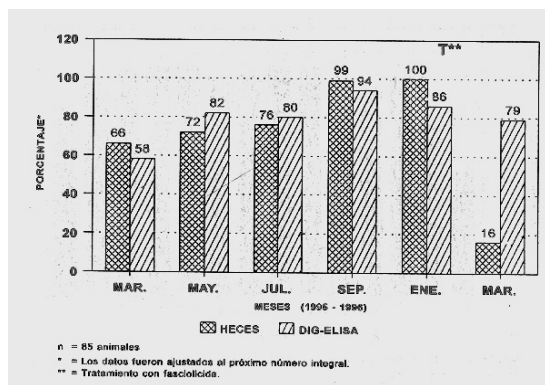


Fig. 3. Diagnóstico de fasciolosis Mediante DIG-ELISA y análisis Coprológico en bovinos infectados en forma natural.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los DZR de la primera semana con los DZR de las semanas 2 a la 14 ($P < 0.01$). No se observaron diferencias entre los DZR debido a diferencia de sexo en los bovinos ($P > 0.01$)

Serodiagnóstico de *F. hepatica* en bovinos infectados en forma natural

DIG-ELISA mostró porcentajes de positividad en el orden de: 58%, 82%, 80%, 94%, 86% y 81% para los meses de marzo, mayo, julio, septiembre, enero y marzo, respectivamente.

Asimismo, la prueba mostró porcentajes de prevalencia similares a aquellos obtenidos en el análisis coproparasitológico ($P < 0.01$). Sin embargo,, no fue posible detectar algunos sueros como falsos positivos o falsos negativos en virtud de que el fasciolicida no removió el 100% de fasciolas de los bovinos y, por ende, DIG-ELISA continuo detectando anticuerpos residuales remanentes (Figura 3). Asimismo, cabe mencionar que los bovinos permanecieron en el área de infección posiblemente algunos

de ellos adquirieron nuevas reinfecciones con metacercarias de *F. hepatica*.

El análisis estadístico no indico diferencias significativas entre porcentajes de prevalencia entre pruebas y su correspondiente muestreo ($P > 0.01$). Sin embargo, si se observaron diferencias al analizar los porcentajes de prevalencia de los meses de marzo y mayo, en relación con los demás meses ($P < 0.01$).

El Cuadro 1 muestra la información obtenida con el análisis coproparasitológico, en donde se observa la evaluación cuantitativa de huevos de *F. hepatica*, mostrando que la intensidad de parasitación fue aumentando gradualmente desde 210 huevos en el mes de marzo hasta lograr su máximo índice de intensidad de la infección en el mes de enero con un máximo de 1033 huevos de parásito, y declinando en el siguiente muestreo con un total de 15 huevos diagnosticados, esto debido a que los animales fueron desparasitados con triclabendazol en el mes de enero. El análisis estadístico indico diferencia; significativas entre las prevalencias obtenidas en los meses de marzo, mayo y Julio de 1995, con respecto a septiembre y enero, a su vez estas fueron diferentes con respecto a las prevalencias de febrero y marzo de 1996 ($P < 0.01$).

Discusión

Maddison¹⁷ señala que la detección de anticuerpos a través de técnicas serológicas son muy importantes en el diagnóstico temprano de enfermedades parasitarias, así como una herramienta de gran utilidad en estudios epidemiológicos.

En México, al igual que en muchas partes del mundo, el diagnóstico de *Fasciola hepatica* ha sido llevado a cabo a través del tradicional método coproparasitológico por sedimentación,³ el cual detecta los huevos del parásito en bovinos aproximadamente a las 11 semanas posinfección,

Cuadro 1
ANALISIS COPROPARASITOSCOPICO DE BOVINOS INFECTADOS EN FORMA NATURAL CON *Fasciola hepatica* PERTENECIENTES A "LAS GAVIOTAS" DE NAUTLA, VERACRUZ

Meses	Núm. de muestras	Núm. de huevos /muestreo	Mínimo	Máximo	Promedio de huevos/animal	± Desviacion estándar	Prevalencia %
Marzo	85	210	0	23	2.5	± 3.4	65.8 ^a
Mayo	85	365	0	36	4.3	± 6.3	71.7 ^a
Julio	84	448	0	43	5.3	± 7.3	76.1 ^a
Septiembre	76	925	1	53	12.1	± 11.6	98.66 ^b
Enero	83	1033	1	68	15.7	± 12.9	100 ^b
Marzo	78	56	0	28	0.96	± 4.0	15.5 ^c

a,b,c: Literales distintas indican valores estadísticamente diferentes ($P < 0.01$).

* En noviembre no se colectó suero ni heces en virtud del mal tiempo.

cuando este se encuentra en su estado adulto en los conductos biliares. Una de sus desventajas es que resulta poco eficiente cuando la carga parasitaria es baja y prácticamente inútil durante el periodo prepatente de la infección.

Por otro lado, la fasciolosis bovina en México rebasa grandemente en importancia a la fasciolosis ovina, en virtud de que se cuenta con aproximadamente 34 millones de bovinos y solamente con 4 millones de ovinos, de ahí la necesidad de instrumentar técnicas serodiagnósticas utilizables en bovinos.

Por tal razón, desde 1971 en que se describió por primera vez la técnica de ELISA,¹⁰ se demostró su versatilidad diagnóstica, habiéndose manifestado la necesidad de diagnosticar la fasciolosis en una etapa temprana.

En Francia para realizar el diagnóstico serológico de esta enfermedad, se ha utilizado la técnica de ELISA indirecta⁶, la cual tiene la ventaja de detectar anticuerpos del parásito desde la tercera semana posinfección en bovinos, pudiendo aportar información sobre infecciones tempranas antes de que *Fasciola* alcance las 10 semanas de edad (madurez). Sin embargo, una de las grandes limitantes de esta prueba es su alto costo, además de que se requiere contar con un lector que difícilmente bajo las condiciones económicas prevalecientes en países en desarrollo se puede obtener. De ahí que la utilidad de esta prueba queda limitada a instituciones con mayor infraestructura como universidades o institutos de investigación, por lo que su aplicación como prueba diagnóstica para laboratorios medianamente equipados no es de fácil acceso.

En lo referente a DIG-ELISA, es una prueba que surgió como alternativa para realizar un diagnóstico basado solamente en la positividad o negatividad de una muestra de suero, pero con la ventaja de poder montarla sin la necesidad de requerir un lector para evaluar la reacción inmunológica. Esto facilita las posibilidades de que la prueba pueda ser llevada a nivel de laboratorios con poca infraestructura.

Una característica importante es que la prueba previamente descrita para ovinos² y bovinos³, se requiere leer en dos días y la modificación instrumentada en esa prueba necesita solamente de 8 horas, generando resultados consistentes cuando se comparan con varias repeticiones de un mismo suero.

Un aspecto que debe mencionarse es que la prueba sólo puede ser útil al diagnosticar bovinos que no hayan sido desparasitados recientemente, ya que como es sabido los bovinos mantienen por algunas semanas anticuerpos remanentes, estos últimos pueden ser identificados por la prueba detectando falsos positivos.

Cabe señalar que la sensibilidad observada (97.5%) es relativa, en virtud de que se desconocía si había otros helmintos en los animales localizados en zona tropical, por lo que resulta necesario aplicar otro estudio sobre antigenicidad cruzada para determinar la reactividad de la prueba y el antígeno utilizado con sueros de animales con otras helmintiasis, particularmente paramfistomiasis.

Por otro lado, los datos analizados mediante DIG-ELISA y coprología en el muestreo de "Las Gaviotas", en la costa de Veracruz, mostraron que la fasciolosis bovina se encuentra distribuida en un alto porcentaje, con esto se corrobora que la parasitosis se localiza en forma enzoótica en el área de estudio.

Se concluye que DIG-ELISA mostró alta sensibilidad y fácil montaje para utilizarse bajo condiciones de campo en el diagnóstico temprano de fasciolosis bovina, generando resultados reproducibles que pueden ser de gran utilidad para estudios seroepidemiológicos.

Abstract

The aims of the study were to determine the sensitivity and specificity of the DIG-ELISA test and to establish the cut-off point value to carry out diagnosis of bovine fascioliasis; to determine the diagnostic capability of the test in artificially infected cattle; to evaluate the seroprevalence during one year of the IgG anti-*F. hepatica* titers of sera from naturally infected bovines, and to compare its variation with the presence of *Fasciola* eggs in the coproparasitoscopic analysis. To standardize the test, eighty sera of adult cattle were used. Forty were from the state of Sonora (free fluke area) and forty from the state of Hidalgo (enzootic area for fascioliasis). The test showed 97.5% sensitivity and 80.0% specificity. The cut-off point value was 7 mm. In another study, fifteen young bovines were infected each with 600 metacercariae of *F. hepatica*. To obtain sera, animals were bled weekly for 14 weeks. The test detected antibodies anti-*F. hepatica* from the second week after infection, showing its major increments in diameter of the zone of reaction (DZR) between the seventh and the tenth week. In another experiment, eighty five crossbred cows located in an enzootic area for fascioliasis were used. They were sampled to obtain sera and faeces every two months for one year to be analyzed similarly to the previous study. Seroprevalence obtained were: 58%, 73%, 80%, 100%, 96% and 79% for the months of March, May, July, September, January and March, respectively, showing similarity in prevalence to the data obtained with the coproparasitoscopic analysis ($P < 0.01$). DIGELISA showed high sensitivity and easy management in the laboratory, therefore, recommended for use under field conditions for early diagnosis of bovine fascioliasis, generating reproducible results which can be of great use for epidemiological studies.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a los doctores Ricardo Campos Ruelas (CIPES-INIFAP) y Juvencio Lagunes Lagunes (CIPEP-INIFAP), por su colaboración en la colecta de sueros de los bovinos en los estados de Sonora y Puebla, respectivamente. Asimismo, hacen patente su reconocimiento al señor Orlando Irizon Capitaine, por las facilidades que dio para utilizar los bovinos de "Las Gaviotas", de Nautla, Veracruz.

Literatura citada

1. Arriaga-Morilla de, C., Paniagua, R., Ruiz-Navarrete, A., Bautista, C. and Morilla, A.: Comparison of dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA), passive haemaagglutination test (PHT) and thin layer immunoassay (TIA) in the diagnosis of natural or experimental *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.*, 30:197-203 (1989).
2. Bautista-Garfias, C.R., LopezArellano, M.E. y Sanchez, A.A.: A new method for serodiagnosis of sheep fascioliasis using helminth excretory-secretory products. *Parasitol. Res.*, 76: 135137 (1985).
3. Benedek, L.: Examination of liver fluke eggs with sedimentation technique. *Allatorov lapak*, 66:139-140 (1946).
4. Benex, J.: Etude comparative de diverses méthodes de diagnostic immunologique de fasciolose hepato-biliaire experimentale du mouton et influence du traitement sur la persistance des anticorps. *Bull. Sac. Path. exot.*, 66: 116-118 (1973).
5. Blancou, J., Bouchet, A. et Daynes, D.: Etude sur L'allergie, les cours d L'infestation des bovines par *Fasciola hepatica*. *Rev. Elev. Méd. Pays trop.*, 24: 373-376 (1971).
6. Boulard, C., Bouvry, M. et Argente, G.: Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et serum et par coproscopie. *Ann. Rech. Vet.*, 16: 363-368 (1985).
7. Burden, D.J. and Hammet, N.C.: Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet. Rec.*, 103:158-162 (1978).
8. Burr-Foster, Q.: Analysis of variance. In: Design of Experiments: A Realistic Approach. 5th ed. Edited by: Anderson, V.H., McLean, R.A., 46-64. *Marcel-Decker*, New York, 1974.
9. Encinas, G.R., Quiroz, R.H., Guerrero, C. y Ochoa, G.P.: Frecuencia de *fasciolosis hepatica* e impacto económico en bovinos sacrificados en el rastro de Ferrería, México, D.F. *Vet. Méx.*, 20:423-426 (1989).
10. Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *J. Immunol.*, 109: 129-135 (1972).
11. Fagbemi, B.O. and Obarisiagbon, I.O.: Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of natural *Fasciola gigantica* infection in cattle. *Vet. Q.J.*, 12: 35-39 (1990).
12. Farrel, C.J., Shen, D.T. and Lang, B.Z.: An enzyme immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 42: 237-241 (1981).
13. Fernández, R.M., Bautista, C.R. e Ibarra, V.F.: Evaluación prueba de DIG-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Fasciola hepatica* en ganado bovino. *Parasitol. Día*, 19:4-9 (1985).
14. Hillyer, G.V.: Use of counterelectrophoresis to detect infections of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, 61:337-339 (1975).
15. Hillyer, G.V., Sanchez, Z. and Leon de, D.: Immunodiagnosis of bovine fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation methods. *J. Parasitol.*, 91: 449-454 (1985).
16. Jemli, M.H., Dorchies, P. et Magnaval, J.F.: Application de la technique ELISA au diagnostic immunologique de la fasciolose ovine: Comparaison avec L'immunofluorescence indirecte et la double diffusion en gelose. *Rev. Méd. Vét.*, 138:355-359 (1987).
17. Maddison, S.E.: Serodiagnosis of parasitic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:457-469 (1991).
18. Quiroz-Romero, H.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. *Limusa*, Mexico, D.F., 1984.
19. Rangel, L.J. y Martínez, E.: Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el Estado de Tabasco, México. *Vet. Méx.*, 25:327-331 (1994).
20. Shaheen, H.I., Kamal, K.A., Farid, Z., Mansour, N., Bector, F.N. and Woody, J.: Dot-enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of human fascioliasis. *J. Parasitol.*, 75: 549-552 (1989).
21. Thorner, R.M. and Remein, B.A.: Principles and Procedure the Evaluation of Screening for Disease. Public Health Me graph No. 67. Publication No. 846. *United States Government Printing Office*, Washington, D.C., 1961.
22. Wescott, R.B., Farrel, C.J. and Shen, D.T.: Diagnosis of naturally occurred *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. vet. Res.*, 45:178-179 (1984).
23. Zimmerman, G.L., Jen, L.W., Cerro, J.E., Farnsworth, K.L. and Wescott, L.B.: Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked-immunosorbent assay. *Am. J. vet. Res.*, 2097-2100 (1982).