

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG FRENTE A *Fasciola hepatica* EN UN REBAÑO BOVINO CRIOLLO LIMONERO DEL MUNICIPIO MARA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

IgG Antibodies Detection Against *Fasciola hepatica* in a Criollo Limonero Cattle Herd from Mara Municipality, Zulia State, Venezuela

Francisco Angulo-Cubillán¹, Everts Chacín¹, Alfredo Sánchez², Marcos Calle³, Sunny Zambrano³, Merilio Montero³, Mario Pérez¹ y Roger Ramírez¹

¹Unidad de Investigaciones Parasitológicas, Laboratorio de Investigación en Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. ²Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

³Estación Experimental El Loral, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. * francisco.angulo@fcv.luz.edu.ve

RESUMEN

Fasciola hepatica es un trematodo que lesiona el hígado de diferentes especies de mamíferos, incluyendo al hombre. Ocasiona en sistemas de producción de rumiantes, graves pérdidas económicas, entre otras, por disminución de la producción o muerte de los animales. El objetivo de esta investigación consistió en detectar la prevalencia y el grado de infección existente, a través de anticuerpos IgG frente a este helminto en suero de ganado Criollo Limonero y en explotaciones del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. Se tomaron 205 muestras de sangre de bovinos pertenecientes a un rebaño de la raza Criollo Limonero, con tubos Vacutainer® sin anticoagulante, extrayendo el suero sanguíneo a través de centrifugación y almacenando los mismos a -20°C, hasta su procesamiento. Adicionalmente, se tomaron muestras de tanques de almacenamiento de leche, en 20 explotaciones ganaderas del Municipio, almacenándolas de manera similar al suero. Para la valoración de los anticuerpos se siguió las instrucciones del kit Porquier®ELISA de verificación de fasciolosis bovina en suero y leche, versión P05120/04. Los resultados se clasificaron en negativos y positivos, éstos últimos en infección leve, moderada y fuerte. El cálculo de la seroprevalencia se realizó mediante fórmulas epidemiológicas. El 7,31% de las muestras de sueros resultaron positivas, de las cuales el 73,33% mostraron infección leve, 20% moderada y 6,66% fuerte. El 30% de las muestras de leche resultaron positivas, de las cuales el 83,33% mostraron infección leve y el 16,66% moderada. Estos resultados sugieren un grado de infección leve de *F. hepatica* en el rebaño bovino criollo limonero estudiado.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, ganado Criollo Limonero, ELISA.

ABSTRACT

Fasciola hepatica is a trematode that injures the liver of different mammals' species, including man. In ruminant production systems, causes serious economic losses because decreased production or death of animals. In order to detecting the degree of pre-existing infection, through IgG antibodies against this helminth in serum from a herd of Criollo Limonero cattle of Mara Municipality, Zulia State, Venezuela. Two hundred five blood samples were taken from a Criollo Limonero cattle herd with Vacutainer® tubes without anticoagulant, extracting the blood serum by centrifugation and storing them at -20°C, until processed. In addition, milk storage tanks, were sampled at 20 farms in the Municipality, by storing them in a similar manner like serum. The titration of antibodies was realized following instructions of Porquier® ELISA kit to detecting bovine fasciolosis in serum and milk, version P05120/04. The results were classified as negative and positive, these last in mild, moderate or strong infection. The calculation of seroprevalence was carried out with epidemiological formulas. Seven point thirty one percent of sera samples were positive, which showed 73.33% mild infection, 20% moderate and 6.66% strong. Thirty percent of milk samples were positive, which 83.33% showed mild infection and 16.66% moderate. These results suggest a degree of mild infection of *F. hepatica* in the herd of Criollo Limonero cattle studied.

Key words: *Fasciola hepatica*, Criollo Limonero cattle, ELISA.

INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica es un trematodo que lesiona el hígado de mamíferos, incluyendo al hombre [7]. En el ganado bovino (*Bos taurus*, *B. indicus*) genera grandes pérdidas económicas por causar de manera directa disminución de la producción cárnica y láctea, además de presentar un cierto grado de mortalidad [1, 2, 26] y a nivel de frigoríficos, el decomiso del órgano parasitado [6, 18]. De manera indirecta se ha descrito que puede llegar a causar problemas hepáticos [24, 25] y reproductivos como infertilidad y abortos [5]. En la zona donde se ha desarrollado el ganado Criollo Limonero ha sido descrita como endémica a esta helmintosis, reportando en diferentes investigaciones altas prevalencias con elevadas abundancias e intensidades medias, además de evidenciar un efecto significativo de las épocas y los meses del año sobre estas variables [1, 2, 8, 9, 14, 16].

El diagnóstico de los animales parasitados se realiza de manera habitual a través de técnicas coprológicas, como la sedimentación o centrifugación [2], las cuales son muy laboriosas y presentan una baja sensibilidad, mostrando un elevado porcentaje de animales falsos negativos [13]. Además, las técnicas coprológicas son incapaces de detectar infecciones tempranas, debido a que el periodo prepatente de esta parasitosis en bovinos se encuentra entre 10 y 12 semanas [19]. Para solventar estas desventajas, se han desarrollado diferentes métodos serológicos, entre ellos el ELISA, que detecta los anticuerpos específicos frente a *F. hepatica* a partir de los 14 días postinfección (dpi) [4, 11, 23].

Se han desarrollado pruebas de ELISA para el diagnóstico serológico de fasciolosis, las cuales presentan disponibilidad comercial. La sensibilidad del ELISA es alta, siendo capaz de detectar a los animales parasitados entre un 98 y 100% en suero sanguíneo y entre 91 y 99% en muestras de leche [3, 13, 20, 21], observándose altas y significativas correlaciones entre los niveles detectados en suero, con los detectados en leche [21]. La habilidad de detectar infecciones tempranas es una gran ventaja, para minimizar el daño hepático causado por los fasciolómulos en su migración y reducir la eliminación fecal de huevos que contribuye a disminuir la tasa de infección [3, 13]. La desventaja del ELISA es que no discrimina infecciones activas o pasadas, como pudiera ser la persistencia de anticuerpos luego de un tratamiento fasciolicida eficaz [20].

En esta investigación se propuso detectar la seroprevalencia y el grado de infección de *F. hepatica* existente, a través de anticuerpos IgG con la versión de ELISA comercial del Instituto Pourquier, en suero de un rebaño de ganado Criollo Limonero y en tanques de leche de explotaciones en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue desarrollada en la Estación Experimental El Laral del Instituto Nacional de Investigaciones Agrí-

colas (INIA) y en 20 explotaciones ganaderas del sector Playa Bonita del municipio Mara, ubicado al noroeste del estado Zulia, Venezuela, durante el mes de abril del año 2008. La región presenta un clima seco tropical con una temperatura y precipitación media anual de 29°C y 600 mm, respectivamente. La zona se encuentra irrigada por el río Socuy, perteneciente a la cuenca hidrográfica del lago de Maracaibo [10].

Los animales utilizados, hembras adultas, pertenecían a un rebaño bovino de raza Criollo Limonero puro y su alimentación se basó en pastos cultivados (*Echinochloa polystachia*), en potreros irrigados por inundación. El número de animales utilizados fue calculado utilizando la fórmula para la determinación del tamaño de la muestra [12], con una prevalencia esperada del 23%, un nivel de confianza de 95% y una precisión del 5%. En un lapso de dos días (d) se tomaron 205 muestras de sangre mediante punción de la vena coccígea, con aguja de calibre 20 G en tubos Vacutainer® sin anticoagulante. Los tubos con las muestras de sangre completa se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo para posteriormente separar el suero mediante centrifugación a 252 g. durante 20 minutos. El suero se colocó en viales plásticos estériles para su congelación (Samsung, Serie Twin RZ80FHIS, Korea) a -20°C, luego de ser transportado en cava refrigerada hasta el laboratorio de Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Las muestras fueron debidamente identificadas al momento de su obtención. Adicionalmente, se tomaron muestras al azar de 20 tanques de almacenamiento de leche en igual número de explotaciones ganaderas del sector, mediante el uso de tubos de ensayo estériles con capacidad de 10 mL, almacenándolas de manera similar al suero. Para la valoración de los anticuerpos se siguió las instrucciones del kit Porquier® ELISA de verificación de fasciolosis bovina en suero y leche, versión P05120/04 [17]. Los resultados se clasificaron en negativos y positivos, éstos últimos en infección leve, moderada y fuerte. El cálculo de la seroprevalencia se realizó a través de la fórmula epidemiológica respectiva [12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados observados en esta investigación para detectar el grado de infección existente, a través de anticuerpos IgG frente a *F. hepatica* en suero y leche del ganado mostraron que, la seroprevalencia en el rebaño estudiado fue de 7,31% y en los tanques de leche de las unidades de producción 30%. Dentro de las muestras séricas positivas, el 73,33% mostraron infección leve, 20% moderada y 6,66% fuerte. Las muestras de leche que resultaron positivas en las fincas muestreadas, el 83,33% mostró infección leve y el 16,66% moderada (TABLA I).

La seroprevalencia de 7,31% en el rebaño detectada en sueros sanguíneos individuales, se diferencia de los resultados reportados por otros autores quienes observaron seroprevalencias desde 67% [22], hasta 81,41% [20], indicando una baja seroprevalencia en el rebaño estudiado. Lo anterior po-

TABLA I
SEROPREVALENCIA Y GRADO DE INFECCIÓN (%)
POR *Fasciola hepatica*, SEGÚN LA CORRELACIÓN DEL
RESULTADO DEL ELISA, CON EL NIVEL DE INFECCIÓN
EN SUEROS INDIVIDUALES Y CON LA PROPORCIÓN
DE LA INFECCIÓN DENTRO DEL REBAÑO
EN TANQUES DE LECHE.

| Seroprevalencia y Grado de Infección | Tipo de Muestra | |
|-----------------------------------------|-----------------|------------------|
| | Suero | Tanques de Leche |
| Nº de muestras | 205 | 20 |
| Seroprevalencia | 7,31 | 30 |
| Leve | 73,33 | 83,33 |
| Moderado | 20 | 16,66 |
| Fuerte | 6,66 | 0 |

dría deberse al régimen de dosificaciones estratégicas a las cuales se encontraba sujeto el rebaño utilizado en la presente investigación, donde las posibilidades de transmisión se reducen por menor eliminación de huevos y contaminación de los mismos al medio ambiente, lo cual disminuye la incidencia de infecciones por *F. hepatica* [15]. Adicionalmente, la eficacia de los tratamientos fasciolicidas eliminan la población de parásitos adultos a nivel de los canalículos biliares, reducen el intercambio y reconocimiento antigénico, por lo que los niveles de anticuerpos específicos frente a *F. hepatica* disminuyen hasta niveles indetectables por ELISA, como lo reportan Guobadia y Fagbeni [11], quienes estudiando los niveles de anticuerpos previo y posterior al tratamiento antihelmíntico, observaron una reducción de los mismos a niveles basales a los 14 d posteriores al tratamiento.

El grado de infección detectado por la técnica de ELISA en el rebaño, concuerda con la distribución habitual de las helmintosis en los mismos, la cual se clasifica como una distribución binomial negativa, donde un pequeño porcentaje de animales son los mayores responsables del mantenimiento de la infección, por servir de hospedadores a mayor cantidad de parásitos [2].

En el caso de la detección de anticuerpos específicos frente a *F. hepatica* en los tanques de leche de las fincas estudiadas, se observó un porcentaje de positividad leve. Sanchís y col. [22] reportaron un 92% de positividad en la evaluación de anticuerpos en leche a través de ELISA en las fincas estudiadas. Este valor, mayor a los resultados observados en esta investigación podría ser debido a las diferencias existentes entre las zonas evaluadas, como puede ser un clima templado y otro tropical. Respecto al grado de infección detectado en los tanques de leche, los resultados son esperables, tomando en cuenta la distribución binomial negativa, donde la leche de los animales negativos o levemente infectados, diluyen los niveles de anticuerpos detectables en la leche de los hospedadores con un grado de infección fuerte. Respecto a lo anterior, Reichel y col. [20] reportan que, los análisis de ELISA en tanques de leche solo son capaces de detectar rebaños con prevalen-

cias entre moderadas a altas, lo que podría explicar el leve porcentaje de fincas positivas observada en este estudio, en una zona endémica a *F. hepatica*.

CONCLUSIONES

La medición de la seroprevalencia y el grado de infección por *F. hepatica* en ganado Criollo Limonero muestra que, la seroprevalencia es baja en el rebaño estudiado y en los tanques de leche de las fincas muestreadas, y el grado de infección predominante es el leve.

La técnica de ELISA es una herramienta favorable para la detección de animales infectados, en muestras de suero o leche, para su utilización en la vigilancia epidemiológica de infecciones por *F. hepatica* en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, por financiar el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANGULO, F.; RAMÍREZ, R.; MUÑOZ, J.; MOLERO, M.; ESCALONA, F.; GARCÍA, L. Prevalencia y carga parasitaria mensual de *Fasciola hepatica* en búfalos (*Bubalus bubalis*) en el Municipio Mara del estado Zulia. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XI (3): 194-198. 2001.
- [2] ANGULO, F.; MOLERO, M.; ESCALONA, F.; MUÑOZ, J.; RAMÍREZ, R. Prevalencia y dinámica de hpg mensual de *Fasciola hepatica* y otros helmintos en un rebaño bovino de una zona inundable tropical. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XVII (2): 111-116. 2007.
- [3] ARIAS, M.; MORRONGO, P.; HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; LOMBA, C.; PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A. Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. **Vet. Parasitol.** 146:46-49. 2007.
- [4] CASTRO, E.; FREYRE, A.; HERNÁNDEZ, Z. Serological responses of cattle after treatment and during natural re-infection with *Fasciola hepatica*, as measured with a dot-ELISA system. **Vet. Parasitol.** 90: 201-208. 2000.
- [5] CHIRINOS, A.R.; DE CHIRINOS, N.I. Evaluación de los efectos de la distomatosis hepática bovina sobre la eficiencia reproductiva y producción lechera. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. III (1): 35-45. 1993.
- [6] CHIRINOS, A.; DE CHIRINOS, N.; ROMÁN, R.; HÓMEZ, G.; PIRELA, H.; RODRÍGUEZ, N. Distomatosis he-

- pática bovina a nivel de dos mataderos industriales del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** X (4): 297-302. 2000.
- [7] FREITES, A.; COLMENARES, C.; ALARCÓN-NOYA, B.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ-UÁREZ, O. Fasciolosis humana en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela: prevalencia y factores asociados. **Invest. Clin.** 50 (4): 497-506. 2009.
- [8] FUENMAYOR, A.; SIMOES, D.; GONZÁLEZ, R.; CHIRINOS, A. Prevalencia de la *Fasciola hepatica* en los Municipios Mara y Páez del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** IX (5): 434-439. 1999.
- [9] FUENMAYOR, A.; SIMOES, D.; GONZÁLEZ, R.; CHIRINOS, A. La distomatosis hepática y su asociación con los factores de riesgo en los Municipios Mara y Páez del estado zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** X (3): 183-190. 2000.
- [10] FUENMAYOR, W. Síntesis socio histórico, cultural y geográfico. **Atlas estado Zulia.** 5ª Ed. Editorial Splanos C.A. Pp 110-113. 2005.
- [11] GUOBADIA, E.E.; FAGBEMI, B.O. Time-course analysis of antibody response by EITB and ELISA before and after chemotherapy in sheep infected with *Fasciola gigantica*. **Vet. Parasitol.** 58: 247-253. 1995.
- [12] MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. Sampling Methods. **Veterinary Epidemiology.** Principles and Methods. Iowa State University Press, Ames, Iowa. EEUU. 380 pp. 1997.
- [13] MOLLOY, J.B.; ANDERSON, G.R.; FLETCHER, T.I.; LANDMANN, J.; KNIGHT, B.C. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. **Vet. Parasitol.** 130: 207-212. 2005.
- [14] MONTIEL-URDANETA, N.; SIMOES, D.; ANGULO, F.; ROJAS, N.; DE CHIRINOS, N.; CHIRINOS, A. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en búfalos y su control a través de la aplicación de albendazoles. **Rev. Científ. FCVLUZ.** XI (1): 5-11. 2001.
- [15] PARR, S.L.; GRAY, J.S. A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. **Vet. Parasitol.** 88: 187-197. 2000.
- [16] PHIRI, A.M.; PHIRI, I.K.; SIZIYA, S.; SIKASUNGE, C.S.; CHEMBENSOFU, M.; MONRAD, J. Seasonal pattern of bovine fasciolosis in the Kafue and Zambezi catchment areas of Zambia. **Vet. Parasitol.** 134: 87-92. 2005.
- [17] Pourquier@elisa bovine fasciolosis serum and milk verification version P05120/04. 326 rue de la Galera - Parc Euromedecine - 34097 Montpellier Cedex 5 – France.
- [18] RAPSCH, C.; SCHWEIZER, G.; GRIMM, F.; KOHLER, L.; BAUER, C.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; TORGERSON, P.R. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. **Int. J. Parasitol.** 36: 1153-1158. 2006.
- [19] REICHEL, M.P. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. **Vet. Parasitol.** 107: 65-72. 2002.
- [20] REICHEL, M.P.; VANHOFF, K.; BAXTER, B. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. **Vet. Parasitol.** 129: 61-66. 2005.
- [21] SALIMI-BEJESTANI, M.R.; DANIEL, D.; CRIPPS, P.; FELSTEAD, S.; WILLIAMS, D.J.L. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. **Vet. Parasitol.** 149: 290-293. 2007.
- [22] SANCHÍS, J.; MIGUÉLEZ, S.; SOLARI, M.A.; PIÑEIRO, P.; MACCHI, M.I.; MALDINI, G.; VENZAL, J.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; ARIAS, M S. Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay). **Rev. Ibero-Lat. Parasitol.** 70: 163-171. 2011.
- [23] SANTIAGO, N.; HILLYER, G. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattl and sheep infected with *Fasciola hepática*. **J. Parasitol.** 74: 810-818. 1988.
- [24] TANIMOTO, T.; SHIROTA, K.; OHTSUKI, Y.; ARAKI, K. Eosinophilic proliferative pylephibitis in the liver of Japanese beef cattle with fascioliasis. **J. Vet. Med. Sci.** 60: 1073-1080. 1998.
- [25] VALE, E. O.; CAMACHO, B. J.; OVIEDO, M.; GARCÍA, M.; VALE, O.O. Estudio epidemiológico de la casuística patológica en dos rebaños de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIV (1): 40-53. 2004.
- [26] YOUN, H. Review of Zoonotic Parasites in Medical and Veterinary Fields in the Republic of Korea. **Kor. J. Parasitol.** 47 (Suppl): S 133-S141. 2009.