

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“VALIDACIÓN DEL KIT DE ELISA CON ANTÍGENO SEMIPURIFICADO
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA FASCIOLOSIS EN ALPACAS
(*Vicugna pacos*)”

TESIS

Presentado por:

Bach. DINA CANDELARIA MIRANDA RAMOS

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA - PERÚ

2012

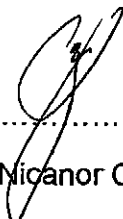
UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“VALIDACIÓN DEL KIT DE ELISA CON ANTÍGENO SEMIPURIFICADO
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA FASCIOSIS EN ALPACAS
(Vicugna pacos)”

Tesis sustentada el 06 de enero del 2012, estando de jurado calificador:

Presidente:


.....
MGR. Juan Nicanor Castro Cancino

Miembro:


.....
MSc. Cecilio Hurtado Quispe

Miembro:


.....
MSc. Facundo Emilio Maquera Llano

Asesor:


.....
MV. Luis Barrios Moquillaza

A Dios por ser mi guía, por iluminar mi sendero cuando más oscuro ha estado, dándome fortaleza para lograr mis objetivos en todos los momentos.

A mis padres Andrés y Valeriana, por su apoyo y comprensión que me han brindado en mi formación profesional.

A mis hermanos Richard, Héctor, Hernán y a mis cuñadas y sobrinos, por el apoyo incondicional y aliento para seguir adelante.

Dina Candelaria Miranda Ramos

AGRADECIMIENTOS

A mis primos Julián y esposa por su apoyo y comprensión.

A los asesores de mi trabajo de Tesis.

Al MV. Luis Barrios Moquillaza, por su asesoría

Al MSc. Ciro Traverso, por su apoyo como coasesor en la ejecución del trabajo de Tesis.

A mis amigos que supieron apoyarme en los momentos más difíciles durante mi vida universitaria y personal.

A mis chatos por acompañarme en los momentos de desvelo durante la redacción del informe de Tesis.

A mi amigo especial por apoyarme siempre.

CONTENIDO

RESUMEN

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
I. MARCO TEORICO.....	5
I.1 MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	5
I.2 ANTECEDENTES.....	23
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
III. RESULTADOS.....	41
IV. DISCUSIÓN.....	46
V. CONCLUSIONES.....	54
VI. RECOMENDACIONES.....	55
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
VIII. ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1:	Tabla Tetracórica: Modelo para la Determinación de Pruebas Diagnósticas.....	37
CUADRO 2:	Tabla Diagnóstica de la Prueba de ELISA y Necropsia para el Diagnóstico de fasciolosis.....	41
CUADRO 3:	Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de ELISA con Antígeno Semipurificado en el Diagnóstico de la Fasciolosis.....	42
CUADRO 4:	Valor Predictivo Positivo y Negativo de la Prueba de ELISA con Antígeno Semipurificado en el Diagnóstico de Fasciolosis.	44

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo de investigación fueron: Determinar la sensibilidad y especificidad del kit de ELISA y Establecer el Valor Predictivo Positivo y Negativo del kit de Elisa con antígeno semipurificado en el diagnóstico de la fasciolosis en alpacas (*vicugna pacos*). Como material de estudio se emplearon: 62 muestras de sueros de alpacas obteniendo una prevalencia general de 24 muestras comprobado mediante el examen post mortem y 38 sueros negativos a fasciolosis. El antígeno utilizado fue de 1 ug/ul producido a partir del antígeno semipurificado de excreción / secreción (E-S), el kit fue producido en el laboratorio ORION de la ciudad de Puno. Obteniéndose los resultados: sensibilidad de 87,50 %, especificidad 86,84 %, el valor predictivo positivo 80,77 % y valor predictivo negativo 91,67 %.

Palabras claves: ELISA, Antígeno semipurificado, *Fasciola hepática*, sensibilidad, especificidad.

ABSTRACT

The objectives of this research were to determine the sensitivity and specificity of the ELISA kit and Set Positive and Negative Predictive Value of Elisa kit semipurified antigen in the diagnosis of fasciolosis in alpacas (*vicugna pacos*). As study material were used: 62 samples of sera from alpacas getting an overall prevalence of 24 samples tested by examining post-mortem and 38 negative sera fasciolosis. The antigen used was 1 ug / ul produced from semi-purified antigen excretion / secretion (ES), the kit was produced in the laboratory ORION in the city of Puno. Obtaining the results: sensitivity of 87,50 %, specificity 86,84 %, positive predictive value 80,77 % and 91,67 % negative predictive value.

Keywords: ELISA, semipurified antigen, *Fasciola hepatica*, sensitivity, specificity.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis en el Perú es una enfermedad endémica de la ganadería, siendo la de mayor prevalencia y responsable de cuantiosas pérdidas económicas por el decomiso de vísceras afectadas por esta parasitosis, que ocasiona disminución de peso del animal, disminución de la calidad de fibra en cuanto se refiere a los Camélidos Sudamericanos, hasta incluso ocasionando la muerte por ser sensibles, la *Fasciola hepática* puede afectar a diferentes especies como bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, al hombre y raramente aves.

Su agente etiológico es la *Fasciola hepática*, es un tremátode que se localiza en los canalículos biliares y migran al parénquima hepático, las alpacas adquieren la parasitosis por la ingestión de metacercarias.

El diagnóstico de la fasciolosis en los animales se realiza por el examen coprológico por el método de Lumbreras o Dennis modificado que a pesar de ser sencillo y de bajo costo no permite detectar la

infección en su periodo prepatente, también por la carga parasitaria y el tiempo que toma en procesar las muestras.

Las pruebas inmunológicas se han planteado como alternativa de diagnóstico para esta parasitosis. La prueba de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) permite un diagnóstico más temprano y detecta los estados juveniles del parásito.

En el trabajo de investigación, se utilizó el método de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de fasciolosis en alpacas, ya que es necesario disponer de nuevas alternativas de diagnóstico de la enfermedad, contribuyendo de esta forma con la implementación de un método de diagnóstico sensible y específico de la fasciolosis. El análisis de las muestras serológicas se realizó en el Laboratorio de Investigación, Análisis y Diagnóstico Clínico "ORION", ubicado en el Centro Camino Real Jr. Lima N°208, 2do piso (parque Pino) de la ciudad de Puno.

Con los resultados de esta validación, el presente de investigación busca contribuir con el conocimiento en el tema de diagnóstico de fasciola en alpacas y de esta manera se aporta una alternativa accesible a nuestros alpaqueros con la detección temprana de la fasciolosis en sus animales, lo que contribuirá a disminuir considerablemente el gasto por tratamiento al estar dirigido únicamente a los animales afectados con la enfermedad.

Asimismo, el objetivo es proporcionar a las autoridades de sanidad una alternativa en el uso de pruebas de diagnóstico en fasciolosis de la región y tomar decisiones oportunas en la solución de esta enfermedad mediante medidas terapéuticas y acciones profilácticas apropiadas tendientes a disminuir los daños en la etapa invasiva de la parasitosis y en consecuencia minimizar el deterioro en la salud y productividad de las alpacas.

El antígeno semipurificado producirá una sensibilidad mayor al 80,00 %, y una especificidad mayor al 85,00 %, en el diagnóstico de la fasciolosis de alpacas. El valor predictivo positivo y negativo de antígeno

semipurificado será mayor al 80,00 % en el diagnóstico de la fasciolosis en alpacas.

Objetivo General:

- Determinar la efectividad del kit de ELISA con antígeno semipurificado en la detección de anticuerpos en el diagnóstico de fasciolosis en alpacas.

Objetivos específicos:

- Determinar la sensibilidad y especificidad del kit Elisa con antígeno semipurificado para el diagnóstico de la fasciolosis en alpacas.
- Determinar el valor predictivo positivo y negativo del kit Elisa con antígeno semipurificado en el diagnóstico de la fasciolosis en alpacas.

I. MARCO TEORICO

1.1. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1.1.1 Fasciola.

La enfermedad es producida por la *Fasciola hepática* o comúnmente llamado "alicuya", "duela del hígado", "gusano del hígado", "jallo jallo" y "distoma", en la zona quechua (alicuya, kallutaka, kispakuro), en la zona aimara (tanta huahua, chuño silpi). Tiene forma de hoja de coca y es propio de los bofedales. Se localiza en los conductos biliares pudiendo tener localizaciones erráticas en pulmones y otros órganos. El parásito es grande llegando a medir 3 cm de diámetro. **(Torres, Quina. 2007; Leguía y col.1999; Bustinza. 2001, Solís. 1997; Espezúa. 2004).**

Hospederos definitivos: alpaca, llama, ovinos, bovinos, caprino, cerdo, équido, roedores y humanos. Hospedero intermediario: caracol *Lymnaea* **(Rojas, Marcelo. 2004)**. Son dextrógiros y tienen gran capacidad reproductiva. Un solo caracol puede llegar a reproducir hasta 25, 000 descendientes y actuar en forma hermafrodita **(Bustinza. 2001)**.

1.1.2 Ciclo biológico.

Es indirecto. Las fasciolas eliminan miles de huevos que salen al exterior con las heces. En el medio ambiente propicio los huevos desarrollan y liberan embriones ciliados llamados miracidios, éstos penetran en los caracoles del género *Lymnaea*, dentro de los caracoles el miracidio se transforma sucesivamente en esporocisto, redia y finalmente cercaría, en cuya forma abandona el caracol, migra a los pastizales y se convierte en metacercaria, la cual constituye la forma infectante. **(Bustinza, 2001).**

Los camélidos sudamericanos se infectan por el consumo de pasto, forraje y agua de bebida, infectados con metacercarias. La metacercaria, al ser ingerida por la alpaca, se desenquista en el estómago liberando la fasciola inmadura precoz, de menos de 1 mm éste, luego atraviesa el intestino, migra por el peritoneo y alcanza el hígado, perforándolos hasta llegar a los conductos biliares donde se hace adulta. En zonas enzooticas pueden producirse infecciones transplacentarias cuando algunos distomas pasan al feto después de atravesar el útero. El periodo prepatente es de 8 semanas en la alpaca **(Bustinza, 2001).**

1.1.3 Sintomatología.

Se presenta bajo 2 formas: La forma aguda; los animales se manifiestan débiles, falta de apetito, dolor a la presión de la zona hepática, postración y la muerte sobreviene en 2 o 4 días. En la forma crónica en la fase migratoria (1-8 semanas), los animales muestran un ligero incremento de peso por la mayor síntesis de globulinas; pero cuando los dístomas alcanzan los conductos biliares aparecen en el los principales síntomas que son: anemia manifestada por la palidez de las mucosas, inapetencia, emaciación progresiva, debilidad, cólicos, edema submandibular, abdomen abultado, diarrea alternada con estreñimiento, la fibra es áspera y se desprende fácilmente, la enfermedad dura mucho tiempo y los animales mueren después de 3 a 4 meses. Los que sobreviven se muestran débiles y pueden ser afectados fácilmente por otras enfermedades parasitarias o infecciosas **(Solis 2006, Bustinza 2001)**.

Los síntomas de la enfermedad dependen de la cantidad y la frecuencia de la ingestión de metacercarias, siendo los síntomas más frecuentes la inapetencia del animal, anemia, pérdida de peso, palidez de

las membranas mucosas, anorexia, letargo, que traducen en la baja de las condiciones e índices productivos del animal **(Espezúa, 2004)**.

1.1.4 Patología.

A la necropsia se puede observar ascitis, edema submandibular, anemia hemorrágica crónica de tipo macrocítica, destrucción necrosis y hemorragia del parénquima hepático, líquido sanguinolento en la cavidad peritoneal, hígado aumentado de tamaño, congestionado, friable y hemorrágico **(Espezua, 2004)**.

En los casos crónicos se puede observar la presencia de gran cantidad de líquido seroso en la cavidad peritoneal, el hígado reducido de tamaño y con diversos grados de cirrosis hepática, los conductos biliares engrosados, prominentes, fibrosos de color blanquecino, que al corte presenta gran cantidad de fasciolas y bilis de color negruzco **(Espezúa, 2004)**.

El hígado se encuentra engrosado, pálido y friable, y muestra numerosos tractos hemorrágicos sobre la superficie y en el parénquima, así como depósitos de fibrina en la superficie hepática y cavidad peritoneal. Se pueden encontrar entre 200 y 500 adultos de *Fasciola hepática* (Soulsby, 1987).

1.1.5 Inmunodiagnóstico.

El diagnóstico definitivo de la infección parasitaria depende en la mayoría de los casos de la demostración de la presencia del parásito en el huésped, es así que el diagnóstico de serología es un método importante para determinar la parasitosis en animales tanto en la fase aguda o invasiva de la infección (fasciolosis), entendiendo que el parásito se encuentra en el parénquima hepático, el cual puede ser demostrado por los métodos de serología (Marco, V. et al 2001).

El diagnóstico de las enfermedades parasitarias comúnmente se realiza por hallazgos directos de elementos parasitarios (huevos, quistes, larvas) desde las excreciones o tejidos del hospedero (heces, orina,

sangre). También existen los métodos inmunodiagnósticos, que para el caso de los parásitos, se han implementado todos los conocidos. Los inmunodiagnósticos son útiles para: la detección de parásitos inaccesibles por los métodos directos, detección de infecciones prepatentes, y detección de infecciones crónicas **(Rojas, Marcelo. 2004)**.

El diagnóstico de rutina de la fasciolosis en los animales se realiza mediante la observación de los huevos del parásito a través del examen coprológico por el método de sedimentación de lumbreras, método que a pesar de sencillo y de bajo costo, no permite diagnosticar la infección en el periodo prepatente y no es muy eficiente cuando la carga parasitaria es leve. Se agrega a ello la necesidad de realizar exámenes seriados para la confirmación de la infección por estos tremátodes, y así tomar medidas pertinentes para su control de esta parasitosis, así como el tiempo que requiere su ejecución (alrededor de 20 minutos por muestra) **(Gorman, T. y col. 1991)**.

En la fase aguda de la enfermedad no se encuentran huevos de fasciola en las heces, pues los parásitos no han llegado a los conductos

biliares y están completamente inmaduros. En la fase crónica el diagnóstico se realiza por el hallazgo de huevos típicos operculados al examen fecal microscópico, mediante el método de Dennis Modificado o el de flotación por medio del Sulfato de Zinc **(Bustinza, 2001)**.

Las pruebas diagnósticas se han evaluado tradicionalmente calculando su sensibilidad y especificidad, la proporción de falsos negativos y de falsos positivos y los valores predictivos positivo y negativo. La sensibilidad (proporción de pacientes con la enfermedad que presentan un resultado positivo) indica qué tan buena es una prueba para identificar a las pacientes enfermas; la especificidad (proporción de pacientes sin la enfermedad que presentan un resultado negativo) indica en qué medida es buena la prueba para identificar a los pacientes que no tienen la enfermedad. La proporción de falsos negativos (proporción de pacientes enfermos que presentan un resultado negativo) y la proporción de falsos positivos (proporción de pacientes sanos que presentan un resultado positivo) son bajas cuando la prueba tiene sensibilidad y especificidad elevadas **(Noel & Sánchez, 2002)**.

Mediante la prueba de ELISA (prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas) la especificidad y sensibilidad se obtuvo con respecto al coproparasitológico de dennis fue del 68,20 % y 60,00 % respectivamente, obteniendo antígenos de excreción y secreción de parásitos adultos de *Fasciola hepática* (Colona & Alzadora, 1995).

Los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo fueron del 100,00 % para la pruebas de ELISA, seroepidemiológicos; por tanto, esta prueba puede sustituir al examen coproparasitológico, tanto en el diagnóstico individual, como en rebaños con infección por *Fasciola hepática*. El ELISA indirecto demostró ser un método sensible y útil para el diagnóstico de fasciolosis pasiva en alpacas (Hillyer et al, 1992).

En Egipto, se efectuó un trabajo con animales, que apuntaba a determinar el efecto de la purificación de antígenos crudos de *Fasciola gigantica* y *Fasciola hepatica* adultas sobre las reacciones cruzadas encontradas en contra inmuno electroforesis (CIEP) y ELISA, con sueros de enfermedades parasitarias y no parasitarias. Así determino que

usando CIEP es más específico el antígeno semipurificado de *F. hepatica* que el antígeno crudo, lo mismo sucedió con la aplicación de ELISA, donde se obtuvo mejores resultados con el antígeno semipurificado **(Khalil et al, 1990).**

Observaron que la presencia de anticuerpos contra antígenos de excreción/secreción (E/S) pudo ser demostrada en el 100% de los animales infectados desde periodos muy tempranos de la infección **(Espino et al, 1987).**

La mayoría de los métodos de diagnóstico indirecto (ELISA) que aparecen reportados en la literatura están basados en la detección de anticuerpos, éstos son los mejores en cuanto al diagnóstico, frente a métodos de diagnóstico coproscópicos, tomando interés respecto a la población diagnosticable y tiempo de diagnóstico **(Hillyer & Soler de Galanes, 1991).**

Investigaciones recientes en busca de alternativas diagnósticas más eficientes y de aplicación a gran escala han demostrado que con las técnicas inmunológicas se puede realizar un diagnóstico temprano de la parasitosis, una de ellas es la prueba de ELISA, es la que ha probado en el diagnóstico de las infecciones por *Fasciola hepática*. Sin embargo, si se lograra purificar de los extractos antigénicos aquellas fracciones de mayor sensibilidad y especificidad contra las formas maduras e inmaduras del parásito, esta eficiencia aumentaría aún más **(Gorman & col, 1991)**.

La prueba de ELISA como una de varias pruebas de diagnóstico serológicos, recomendados, puede detectar la respuesta inmune de corderos contra *Fasciola hepática* a partir de la segunda semana de infección **(Jemli et al, 1992)**.

En un trabajo de experimentación con animales de laboratorio comprobaron que en el suero se puede detectar anticuerpos a partir del octavo día post infección por la prueba ELISA **(Curzel, 2001)**.

1.1.6 Pruebas directas.

1.1.6.1 Método de Dennis Modificado

Es un método coparásitológico de concentración, sirve para el hallazgo de huevos de fasciola hepática, Paramphistomun y Metastrongylus, diseñado especialmente para fasciolas cuyos huevos requieren un tratamiento cuidadoso debido a su tamaño y fragilidad por ejemplo de centrifugación que tienden a romperlos. Se colecta una muestra de 2 – 3 g de heces, para desmenuzarlo en el mortero u homogenizarlo con la bagueta (**Rojas, 1990**).

1.1.7 Pruebas indirectas.

a. Elisa

La técnica **ELISA** (*Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las

propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplean reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. **(Reina, 2003).**

b. Elisa Indirecto

La prueba de Enzimoimmunoanálisis (ELISA), consiste en la demostración del anticuerpo presente en el suero del infectado (anticuerpo primario), que se liga a un anticuerpo específico (anticuerpo secundario), el cual se encuentra marcado con una enzima; la adición del sustrato correspondiente y un cromógeno, da lugar a un producto coloreado. El color es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero y puede ser medido en un espectrofotómetro (lector de ELISA) o hacerse la lectura visualmente. El método emplea como soporte del antígeno la superficie de los pozos de una placa de microtitulación **(Naquira y col, 1999).**

La prueba se utiliza para detectar la presencia de antígeno o anticuerpos, o de ambos, en una muestra, y se determina por la acción de una enzima (inmuno-peroxidasa) que se agrega al sustrato en la unión antígeno-anticuerpo. La actividad enzimática constituye la medida de la cantidad de Ag o Ac presente en la muestra. La actividad enzimática puede seguirse por el cambio de color (originado por la hidrólisis del sustrato) que se observa directamente o se mide en un fotolorímetro. **(Ferreira, 2003).**

1.1.8 Antígeno.

Es una sustancia que estimula la formación de un Ac en células que reaccionan específicamente de esos Ags. La mayoría de los Ags completos son proteínas, pero algunos son polisacáridos o polipéptidos, es decir, la mayor parte de los Ags son macromoléculas con peso molecular mayor de 10 000. Para funcionar como Ags, las sustancias deben ser reconocidas como extrañas o no propias por el animal, ya que en general los animales no producen Acs a sus propias proteínas **(Jawtez E. 1985).**

Los antígenos son sustancias que pueden estimular en un animal la elaboración de ciertas proteínas, denominadas anticuerpos, las cuales tienen la facultad de reaccionar con ellos de manera específica. **(Ferreira. 2003).**

1.1.9 Anticuerpo.

Son proteínas que son formadas como respuesta a un Ag y reaccionan específicamente con dicho Ag o con uno muy estrechamente relacionado con él. Solamente los vertebrados sintetizan Acs. Estas proteínas especializadas se denominan también inmunoglobulinas **(Jawtez E. 1985).**

Los anticuerpos son proteínas especializadas, llamadas inmunoglobulinas, que tienen la característica de reaccionar con un antígeno; su producción está a cargo de las células plasmáticas, y en el plasma representan el 10 al 20 % de las proteínas totales. Se reconocen varias clases de inmunoglobulinas que se han nombrado cada una con

una letra A, G, M, D y E, cuya estructura básica es similar en todas ellas, con las variaciones propias de cada una, atribuibles a los determinantes antigénicos especiales y a las diferencias moleculares correspondientes a su arquitectura y configuración especial, que les confiere la especificidad de reaccionar con un antígeno en particular **(Ferreira, 2003)**.

Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B, mayormente estimulados por los linfocitos T ayudadores, que estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos. Existen 4 clases de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgE **(Rojas, M. 1990)**.

1.1.10 Ig M.

La macroglobulina IgM es una inmunoglobulina intrigante porque la mayor parte de sus funciones pueden ser asumidos por la IgG. Filogenéticamente la IgM aparece antes del desarrollo de la IgG, puesto que los vertebrados primitivos tienen la IgM pero no la IgG. La IgM es la primera que se produce en el feto en desarrollo. Igualmente en la respuesta inmune del adulto la IgM aparece antes que la IgG como anticuerpo específico **(P.M. Outteridge)**. Representa el 10,00 % de las Ig

totales. Es el principal componente de las Ig fijadas a la superficie de los linfocitos B (en forma de monómero) **(Cohaila, 1998)**.

La inmunoglobulina M, a menudo llamada macroglobulina por su alto peso molecular, es un polímero de una misma molécula, esta inmunoglobulina es un agente aglutinante y citolítico muy eficiente y aparece rápidamente en respuesta a la infección sanguínea, por lo cual, es de particular importancia en los casos de bacteremia; además, es la que mejor fija el complemento e inicia su activación por la vía clásica. **(Ferreira, 2003)**.

1.1.11 Ig G.

Esta corresponde aproximadamente, al 80,00 % de las inmunoglobulinas totales; pasa más fácil que las otras al espacio extravascular y allí actúa para neutralizar toxinas y captar microorganismos que luego son destruidos por mecanismos de citotoxicidad, aglutinación y fagocitosis. **(Ferreira, 2003)**.

La IgG es el principal caballo de batalla del “establo” de las Igs, junto con la IgA, es la inmunoglobulina más importante sintetizada durante la respuesta secundaria, se difunde con mayor facilidad que las demás inmunoglobulinas hacia los espacios extravasculares corporales. **(M. Roitt, 2003).**

1.1.12 Sensibilidad.

Es la proporción de individuos con la enfermedad que tienen una prueba positiva. La sensibilidad nos indica cuán buena es una prueba diagnóstica para identificar una enfermedad. Por lo que se llama proporción de verdaderos positivos. **(O. Avalos, 2000).**

1.1.13 Especificidad.

Es la proporción de sanos que tiene una prueba negativa. Es decir, la especificidad valora la utilidad de una prueba a los fines de identificar a los no enfermos (proporción de verdaderos negativos). **(O. Avalos, 2000).**

1.1.14 Valor predictivo positivo.

Es la probabilidad de que un animal con prueba positiva tenga la enfermedad. Corresponde a los animales enfermos con pruebas positivas de entre todas las pruebas positivas. **(O. Avalos, 2000).**

1.1.15 Valor predictivo negativo.

Es la probabilidad de que un animal con prueba negativa no tenga la enfermedad, es decir, que esté realmente sano. Corresponde a los animales sanos con pruebas negativas de entre todas las pruebas negativas. **(O. Avalos, 2000).**

1.1.16 Valor global o índice de validez.

Es la probabilidad de que un animal sea clasificado correctamente por la prueba. **(O. Avalos, 2000).**

1.2. ANTECEDENTES

Li Olga et al. Lima - Perú 2005, estandarizaron la prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos para el diagnóstico de *Fasciola hepática* en alpacas. Ellos emplearon los productos de excreción y secreción (E - S) como antígeno, Se obtuvo un inmunoc conjugado de peroxidasa anti-IgG de alpacas por cromatografía de afinidad a proteína A, trabajaron con 40 muestras, las cuales se dividieron en 2 grupos controles: 1 grupo control positivo conformado por 12 alpacas procedentes de zonas endémicas de crianza extensiva y mixta (ovinos y bovinos); y un grupo control negativo conformado por 28 alpacas donde no se alterna la crianza con bovinos y ovinos; y con un control de desparasitación. De los 40 sueros se obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 100.00 % respectivamente. Todos los animales del grupo control positivo resultaron positivos a la prueba de ELISA. De igual forma los animales del grupo control negativo resultaron negativos a la prueba de ELISA. Por lo tanto, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron del 100.00 %.

Vargas L. Danilo et al. Santiago-Chile 2001, realizaron la implementación de un ensayo de ELISA en equinos naturalmente

infectados con *Fasciola hepática* con la excreción y secreción de antígenos de fasciolas adultas. La estandarización se realizó con 2 sueros negativos y con un suero positivo provenientes de la XII Región de Chile confirmados al examen post mortem de los equinos sacrificados. La evaluación se realizó en 226 muestras divididas en 4 grupos: 70 sueros positivos confirmados al examen para fasciola, 115 sueros negativos, 19 sueros con otras patologías y 22 sueros de equinos aparentemente sanos. Con este ensayo de ELISA se obtuvo los siguientes resultados: Sensibilidad 85,70 %, especificidad 97,40 %, valor predictivo positivo 93,80 %, y valor predictivo negativo 93,80 %; estos concuerdan con los resultados obtenidos en otras especies de abasto tales como bovinos, ovinos y porcinos.

Gorman Texia et al. Santiago-Chile 1998, evaluaron y caracterizaron la respuesta inmune humoral de bovinos naturalmente infectados con *Fasciola hepática*, frente a un extracto total de antígenos de excreción - secreción (E - S) y a una fracción antigénica semipurificada cromatográficamente (<30 kDa), seleccionada previamente por su eficiencia diagnóstica en otras especies. Ambos preparados antigénicos fueron analizados mediante ELISA en microplaca y electroforesis en geles

de poliacrilamida en condición de desnaturalización (SDS-PAGE) y posterior inmuno-electrotransferencia enzimática o Western Blot. La evaluación se realizó en 118 muestras divididas en 3 grupos: 52 sueros de bovinos con fasciolosis comprobada mediante examen post mortem, 18 sueros de animales sin la infección y 48 sueros de vacunos infectados con hidatidosis, pero sin fasciolosis. Se observó que de los 52 sueros positivos, el resultado serológico fue en 28 (53,80 %) de ellos, quedando 24 (46,20 %) sueros como falsos negativos. Por otra parte los 18 sueros de vacunos sanos resultaron negativos a la prueba. Obteniéndose en el ELISA con extracto crudo (E - S) una sensibilidad de 53,00 % y especificidad 100,00 %, en tanto que con la fracción semipurificada se obtuvo una sensibilidad mayor de 90,00 % y especificidad de 100,00 %, esto, debido a que de los 52 sueros positivos 5 fueron negativos a ELISA, dando una concordancia de 90,40 % y sensibilidad de 90,00 %. Todos los sueros de bovinos sanos, fueron negativos a la prueba, obteniendo una especificidad de 100,00 %.

Gorman Texia et al. Santiago-Chile 2000, evaluaron el Valor Predictivo de éxito terapéutico de una fracción semipurificada de < 30 KDa de *Fasciola hepática*, empleando ELISA y Western Blot en el reconocimiento antigénico de ovinos infectados. El ensayo de ELISA se

realizó en microplacas. Quince ovinos fueron infectados naturalmente después de permanecer un mes en un predio de una zona endémica, siendo evaluados cada mes durante 12 meses. Se emplearon sueros controles positivos y negativos a *Fasciola hepática* y "pools" de sueros ovinos con otras parasitosis y sin fasciolosis.

Fredes Fernando et al. Santiago-Chile 2003, utilizaron dos proteínas antigénicas de *Fasciola hepática*, una de 14 kDa y otra de 29 kDa, ambas fueron purificadas por la técnica de electroelución a partir de un antígeno de excreción - secreción (E - S) de fasciolas adultas. Estas proteínas fueron evaluadas por separado, mediante una técnica de ELISA utilizando para ello sueros de ovinos con fasciolosis, sueros de ovinos sin fasciolosis y sueros de ovinos con otras parasitosis. La proteína de 14 kDa tuvo una sensibilidad baja de 60,00 % y una especificidad del 100,00 %, mientras que su valor predictivo positivo fue de 100,00 % y el negativo de 77,00 %. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para la proteína de 29 kDa fueron de un 94,00 % y 98,00 % respectivamente, mientras que el valor predictivo positivo fue de 97,00 % y el negativo de 96,00 %.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE ESTUDIO.

El presente trabajo de investigación "Validación del kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de fasciolosis en alpacas (*Vicugna pacos*)" se realizó en el Camal Municipal del distrito de Ayaviri, provincia Melgar en la región de Puno. Ubicado a 14° 53' latitud sur, 70° 35' longitud oeste del meridiano de Greenwich y una altitud que fluctúa entre los 3 890 m.s.n.m. a 4 266 m.s.n.m, la temperatura varía de 18 a 20° máxima a 0° mínima, con una población de 72, 005 habitantes de los cuales el 58,00% es rural. Se encuentra limitado por el norte con la provincia de Carabaya, por el Sur con la Provincia de Lampa, por el este con la provincia de Azángaro y por el Oeste con el departamento de Cusco (**SENAMI, 1999**).

Su clima es variado, se distinguen dos estaciones bien marcadas una lluviosa de octubre a marzo y la otra seca e invernal de abril a septiembre. Se llega por carretera asfaltada y ferroviaria desde la capital

Puno, con un recorrido de 96 Km. Su fauna podemos destacar la crianza en un gran porcentaje de ganado como la alpaca en sus diferentes variedades (suri, huacayo), el vacuno (muchos de estos ya mejorados), el ovino y en muy poca cantidad el porcino. Pero también encontramos las vicuñas de preciada lana, la llama, el burro, el caballo (en buena cantidad en los distritos de Nuñoa y Macarí considerado como la capital hípica), aves de corral (gallinas, cuyes, patos, conejos, etc).

2.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.

La población faenada estuvo constituida de un total de 80 alpacas que se beneficiaron durante 1 mes, en el camal municipal del distrito de Ayaviri de la región Puno. Siendo el tamaño de muestra analizada de 62 alpacas, comprendidas entre machos y hembras de la raza Huacaya.

2.3 MATERIALES.

En la presente investigación se utilizaron los siguientes materiales:

2.3.1 Material biológico.

- 62 muestras de suero sanguíneo de alpacas sin anticoagulante.

2.3.2 Equipo y material para el trabajo en campo.

- Jabón carbólico,
- Alcohol yodado,
- Algodón,
- Torniquete,
- Guantes desechables,
- Tablero de apuntes,
- Botas de jebe,
- Mandil,
- Cintas maskintein,
- Marcador de ganado,
- Cámara fotográfica,
- Caja para conservación de muestras.

2.3.3 Equipo y material para el trabajo en laboratorio.

- Kit de ELISA ORIÓN para diagnóstico de *Fasciola hepática* en alpacas.
- Tips para micro pipetas amarillas y azules.
- Frascos de 1 litro.
- Frascos de 100 ml.
- Probetas de 100 ml y 1 litro.
- Pipetas de 5 ml y 10 ml.
- Parafilm.
- Guantes de látex.
- Papel absorbente tipo toalla.
- Micropipeta de 5 – 50 ul.
- Micropipeta múltiple 50 – 300 ul.
- Estufa 37°C.
- Refrigerador.
- Balanza analítica.
- Centrífuga.
- Sueros problema.
- Agua destilada.

2.4 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El procedimiento a seguir es:

2.4.1 Recolección de campo: Obtención del anticuerpo

a. Obtención de muestras sanguíneas.

La obtención de las muestras sanguíneas se realizó por punción venosa de la siguiente manera:

- Se sujetó a la alpaca y se realizó la hemostasia con la ayuda de una soga en el tercio inferior del cuello.
- Se identificó el lugar de la venopunción para luego realizar la limpieza de la piel con alcohol yodado al 3,00 %; realizándose la punción percútanea para obtener sangre de la vena yugular en una cantidad aproximada de 10 ml en un tubo de ensayo de 20 ml debidamente rotulado y sin anticoagulante.
- La muestra de sangre recolectada se dejó coagular a temperatura ambiente (protegida de la luz solar directa) cerrando el tubo y colocándolo en posición inclinada.

- Las muestras fueron transportadas en un cooler debidamente rotuladas para su trabajo en el laboratorio.

b. Obtención y conservación del suero.

- Se centrifugó las muestras sanguíneas a 3500 rpm durante 5 minutos.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró el suero obtenido de cada tubo hacia un vial de plástico, aproximadamente 2 ml. de capacidad y luego se cerró herméticamente asegurando con esparadrapo.
- Procediéndose a rotular los viales.
- Una vez obtenido aproximadamente 2ml de muestras de suero (no hemolizadas), Se conservó en refrigeración a (4° C) por 24 a 48 horas y por mayor tiempo en congelación (freezer. -20° C).

c. Examen post mortem (Gold Estandar).

El examen post mortem de las alpacas se realizó en forma minuciosa, mediante inspección, palpación, y cortes en el hígado, observándose los canalículos biliares para la determinación de la presencia del parásito. Cada una de las alpacas seleccionadas previamente, fueron

identificadas de acuerdo al código establecido antes de su sacrificio para así poder registrar los resultados en una ficha epidemiológica (anexo 1).

2.4.2 Método de laboratorio: Método de ELISA.

1. Se adhirió el antígeno: 100 ul de E/S de *Fasciola hepática* (1/100), diluido en Tris. HCl 0.01M Ph 7,5 a una concentración de 1 ug de proteínas/ml. A los pozos de la placa de microtitulación (fondo plano-corning) que fueron empleados en la prueba.
2. Se cubrió la placa con su tapa, parafilm para evitar la evaporación, incubándose a 38 °C X 2 horas, refrigerándose a 4 °C durante toda la noche o un mínimo de 8 horas.
3. Se eliminó el contenido de los pozos de la placa realizando el lavado con buffer de lavado o PBS-Tween para remover el exceso de antígeno: colocándose 200 ul de buffer de lavado en cada pozo por 5 veces utilizando el lavador de ELISA.
4. Se adicionó 100 ul X pozo de solución diluyente, cubriendo la placa con su tapa e incubando en estufa a 37°C X 30 minutos.
5. Se realizó el lavado de los pozos al igual que en el paso N°3. Secar y refrigerar hasta su uso, colocando sobre la placa parafilm.

6. Retirar la placa de la refrigeración y colocar a temperatura ambiente por espacio de 10-20 minutos.
7. Se añadió a los pozos, 100ul de la dilución del suero problema (SP) en solución diluyente, en una dilución 1/100, los sueros controles (SC): Negativo (SCN), Positivo (SCP), luego se cubrió la placa con parafilm.
8. Se incubó a 37°C X 1-2 horas.
9. Se eliminó el contenido de los pozos de la micro placa en un recipiente que contenía lejía al 5 %, mediante inversión de la micro placa.
10. Se lavó nuevamente los pozos, igual que en el paso N° 3
11. Se añadió a cada pozo 100ul del conjugado Anti IgG Alpaca marcada con peroxidasa (dilución 1/1000) en PBS-Tween (La dilución de trabajo del conjugado lo señala el laboratorio fabricante), cubrir la placa.
12. Se incubó a 37°C X 1-1,5 horas.
13. Se eliminó el contenido y se realizó el lavado de los pozos de la placa igual que en el paso N° 3.
14. Se agregó 100 ul X pozo del sustrato-Cromógeno (OPD).
15. Se incubó por 20 minutos en la oscuridad (cubriendo la placa con papel aluminio).

16. Se detuvo la reacción con 25 ul de Ac. Sulfúrico.

17. La lectura se realizó por lectura óptica.

2.5 MÉTODOS

a. Método de recolección del campo: Obtención del anticuerpo.

El método empleado en el campo fue mediante la punción y extracción de sangre proveniente de la vena yugular (pág 23). Una vez recolectadas y rotuladas las muestras, se procedió a llevar los datos a una ficha de recolección de muestras para su evaluación en el laboratorio, ya que estos datos son necesarios para hallar nuestro primer y segundo objetivo. Asimismo se llevó a cabo el examen post mortem como prueba de oro (pág. 24).

b. Método de laboratorio.

Una vez que las muestras sanguíneas fueron recolectadas, estas fueron analizadas y procesadas en el Laboratorio de Investigación,

Análisis y Diagnóstico Clínico ORION de la ciudad de Puno. Para realizar el análisis de las muestras se utilizó el método de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra fasciola hepática (pág. 24). Se utilizó como antígeno semipurificado la excreción y secreción de fasciolas adultas cuantificado por el método de Lowry.

c. Método estadístico de análisis.

Con la recolección de los datos obtenidos en el laboratorio y a la necropsia se empleó la prueba diagnóstica con el uso de la tabla tetracónica (pág. 27) para poder hallar el primer y segundo objetivo de nuestra investigación. Asimismo se realizó el análisis estadístico con el Intervalo de Confianza al 95.00 % (pág.29).

2.6 MÉTODO Y ANÁLISIS DE LA INVESTIGACIÓN

Para realizar el análisis de datos del primer y segundo objetivo se tendrá en cuenta la prueba diagnóstica, para lo cual se hizo uso de la tabla tetracónica y el análisis estadístico.

2.6.1 Prueba diagnóstica

En donde se utilizó la Tabla diagnóstica (tetracórica) para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA. Asimismo como el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Cuadro I. Tabla Tetracórica: modelo para determinación de pruebas diagnósticas

PRUEBA DIAGNÓSTICA		NECROPSIA		Total
		Examen postmortem		
ELISA		Enfermo	Sano	
Presencia de	Reactivo	VP	FP	VP+FP
Anticuerpos específicos contra Fasciolosis	No reactivo	FN	VN	FN+VN
TOTAL		VP+FN	FP+VN	VP+FP+FN+VN

Fuente: Unidad de epidemiología clínica y bioestadística.

Dónde:

VP: Verdaderos Positivos

FP: Falsos Positivos

FN: Falsos Negativos

VN: Verdaderos Negativos

✓ **Para el primer objetivo:**

Para el cálculo de los valores se utilizó los resultados que se obtuvieron una vez terminado el procedimiento de ELISA, empleando las siguientes fórmulas:

• **Sensibilidad (S):**

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

• **Especificidad (E):**

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

✓ **Para el segundo objetivo:**

Se aplicaron las fórmulas tanto del valor predictivo positivo y negativo para obtener la seguridad del kit de ELISA es decir, si realmente los animales que hayan tenido un resultado positivo a la prueba en realidad tengan la enfermedad, utilizando datos como: número de animales que hayan resultado positivos a la prueba o viceversa.

Para la seguridad de la prueba se utilizó las siguientes fórmulas:

- **Valor Predictivo Positivo (VPP):**

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- **Valor Predictivo Negativo (VPN):**

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

2.6.2 Análisis estadístico

Una vez obtenido los datos se procedió a realizar las Inferencias Estadísticas como son: El Intervalo de Confianza al 95.00 % (IC), mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$IC = p \pm Z \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

Donde:

P = Proporción Estimada

Z = 1,96 (coeficiente de confianza)

p = Probabilidad de éxito

q = Probabilidad de fracaso

n = Número de muestras

III. RESULTADOS

3.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL KIT DE ELISA CON ANTÍGENO SEMIPURIFICADO PARA EL DIAGNOSTICO DE FASCIOLOSIS.

Cuadro II. Tabla diagnostica de la prueba de Elisa y necropsia para el diagnóstico de la fasciolosis

Prueba diagnóstica ELISA		NECROPSIA		TOTAL
		Examen postmortem		
		Enfermo	Sano	
Presencia de Anticuerpos específicos contra Fasciolosis	Reactivo	21	5	26
	No reactivo	3	33	36
TOTAL		24	38	62

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro II, expresa los resultados de la detección de anticuerpos específicos contra la Fasciolosis, notándose que de 24 alpacas enfermas, el Kit de Elisa detectó a 21 Verdaderos positivos y 3 resultaron Falsos Negativos. Por otro lado, de 38 alpacas sanas al examen post mortem (necropsia), el Kit de Elisa detectó a 33 Verdaderos Negativos y 5 resultaron Falso Positivos. Dichos resultados se obtuvieron contrastando los resultados obtenidos por el método de Elisa y a la necropsia (Anexo 3).

Cuadro III. Sensibilidad y especificidad de la prueba de elisa con antígeno semipurificado en el diagnóstico de la fasciolosis

KIT DE ELISA	%	IC 95%	
		Inferior	Superior
SENSIBILIDAD	87,50	79,27	95,73
ESPECIFICIDAD	86,84	78,43	95,26
INDICE DE VALIDEZ	87,10	78,76	95,44

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro III, primero indica que la sensibilidad de detección de anticuerpos específicos contra la Fasciolosis en alpacas, mediante la prueba de Elisa con antígeno semipurificado, es de 87,50 %, es decir, esta es la proporción de positivos detectados en el tamizaje entre las alpacas verdaderamente enfermas que fueron determinadas por el diagnóstico de referencia post mortem. Segundo, se muestra que la especificidad es de 86,84 %, es decir, esta es la proporción de NEGATIVOS entre las alpacas verdaderamente negativas, producto de la efectividad de la prueba de Elisa con antígeno semipurificado. Dichos resultados se obtuvieron utilizando las fórmulas diagnósticas de Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN. (Anexo 4).

El índice de validez de la prueba de Elisa es óptima y aplicable (87,10 %) para el tamizaje de la Fasciolosis en alpacas. Así mismo, el intervalo de confianza para la sensibilidad es de 79,27 % hasta 95,73 %; para la especificidad es de 78,43 % hasta 95,25 %, los cuales también validan la utilidad de la prueba de Elisa. Estos resultados se obtuvieron empleando el análisis estadístico de IC (Anexo 5).

3.2 DETERMINACIÓN DEL VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DEL KIT DE ELISA CON ANTÍGENO SEMIPURIFICADO PARA EL DIAGNOSTICO DE FASCIOLISIS.

Cuadro IV. Valor predictivo positivo y negativo de la prueba de elisa con antígeno semipurificado en el diagnóstico de fasciolosis

KIT DE ELISA	%	IC 95%	
		Inferior	Superior
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	80,77	70,96	90,58
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	91,67	84,79	98,55

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro IV, indica que el Valor Predictivo Positivo encontrado contra la fasciolosis en alpacas, mediante la prueba de Elisa con antígeno semipurificado, es de 80,77 %, es decir, que esta es la proporción de los VERDADERAMENTE POSITIVOS detectados entre las alpacas verdaderamente enfermas determinadas por el diagnóstico de referencia

(necropsia). Segundo, se muestra que el Valor Predictivo Negativo es de 91,67 %, es decir, que es la proporción de las alpacas VERDADERAMENTE NEGATIVOS entre las alpacas negativas, detectado con la prueba de Elisa con antígeno semipurificado. (Anexo 4 y 5).

IV. DISCUSIÓN

4.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL KIT DE ELISA CON ANTÍGENO SEMIPURIFICADO EN EL DIAGNÓSTICO DE FASCIOLOSIS EN ALPACAS.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigación para el diagnóstico de fasciolosis en alpacas fueron: Sensibilidad: 87,50 % y especificidad de 86,84 % comparándolo con Li Olga (Lima-Perú, 2005), que trabajo en alpacas; presentó una Sensibilidad y Especificidad del 100,00 %, observamos que nuestros resultados son menores, posiblemente se deba al antígeno que se utilizó y las muestras de suero con las que se trabajaron, también hay que tomar en cuenta que el trabajo que realizó Li Olga, obtuvo su antígeno a través de la Técnica de mantenimiento in vitro en comparación a nuestro trabajo de investigación se trabajó con antígeno producto de la excreción y secreción de fasciolas adultas de bovinos y no de alpacas, a su vez se trabajó con suero de alpacas de diferentes edades, la diferencia de estos resultados radica más en la preparación del antígeno.

Los resultados obtenidos por Vargas L. (Santiago-Chile, 2001), encontró una sensibilidad de 85,70 % y especificidad de 97,40 %, al compararlo con nuestros resultados podemos apreciar que nuestra sensibilidad es mayor y la especificidad es menor; esta diferencia puede deberse a que el estudio que realizó Vargas (2001) lo ejecutó en equinos y utilizó como antígeno la E-S de fasciolas adultas de equinos, a comparación de la nuestra que se realizó en alpacas y la preparación antigénica se hizo por el método de Lowry, puede deberse también a que la reacción es diferente en cada especie y depende mucho del estado del animal.

Estudios realizados por Gorman Texia (Santiago-Chile, 1998) en donde trabajó con 2 antígenos y obtuvo los siguientes resultados: con el extracto crudo una sensibilidad de 53,00 % y especificidad del 100,00 %, comparando podemos observar que nuestra sensibilidad es mayor y la especificidad es menor, esta diferencia puede deberse a la calidad del antígeno utilizado, en nuestro trabajo de investigación se utilizó un antígeno semipurificado y se trabajó con alpacas a diferencia de Gorman, quien trabajó con bovinos; asimismo con la fracción semipurificada < 30 KDa obtuvo una sensibilidad de 90,00 % y especificidad de 100,00 %; podemos observar que nuestra sensibilidad y especificidad es menor,

esto puede deberse a la calidad y concentración del antígeno utilizado ya que nosotros trabajamos con una proteína de 21 KDa que se obtuvo por cuantificación en el método de Lowry y también debido a que trabajó con suero de bovinos a diferencia de nosotros que utilizamos suero de alpaca.

Según Gorman Texia (Santiago-Chile, 2000), encontró valores de Sensibilidad y especificidad del 100,00 %, comparando con nuestros resultados observamos que son menores, esto puede deberse a que empleó la técnica de Elisa y Wester Blot a diferencia de nuestro trabajo de investigación en donde se utilizó una proteína de 21 KDa empleándose el método de Elisa y el uso de suero de alpacas y no de ovinos.

Los resultados encontrados por Fredes Fernando (Santiago-Chile, 2003), quien trabajó con suero de ovinos, obtuvo una sensibilidad de 60,00 % y especificidad de 100,00 %, en comparación con nuestros resultados nuestra sensibilidad es mayor y especificidad es menor, estas diferencias pueden deberse a que en nuestro estudio de investigación se trabajó con una proteína de 21 KDa y la calidad del antígeno es mucho mejor a diferencia de fredes que trabajó con una proteína de 14 KDa.

Asimismo Fredes Fernando (Santiago-Chile, 2003), obtuvo una sensibilidad de 94,00 % y especificidad de 98,00 % a diferencia de nuestra investigación nuestros resultados son inferiores en sensibilidad y especificidad, esto puede deberse a que se trabajó con una proteína de 29 KDa y con muestras de sueros de ovinos usando la técnica de SDS-PAGE y electroelución a diferencia de nuestro trabajo donde se utilizó una proteína de 21 KDa, por la especie de estudio empleado, lugar de estudio y calidad del antígeno.

Estudios realizados por Colona y Alzadora (1995), indican que obtuvieron una sensibilidad de 68,20 % y especificidad de 60,00 %, nuestra sensibilidad y especificidad es mayor, posiblemente se deba a que utilizaron la técnica de coproparasitológico de Dennis Modificado, lugar de estudio en comparación de nuestro trabajo de investigación en donde se empleó un antígeno semipurificado, asimismo porque las técnicas empleadas son muy diferentes en el procesamiento de las muestras, con nuestro método de Elisa procesamos las muestras más rápido y la calidad del antígeno es mejor.

4.2 VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DEL KIT DE ELISA CON ANTÍGENO SEMIPURIFICADO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA FASCIOSIS EN ALPACAS.

Los resultados encontrados en este trabajo de investigación para establecer el VPP y VPN del kit de ELISA con antígeno semipurificado fueron de 80,77 % y 91,67 % respectivamente. Trabajado con suero de alpacas y fasciola de bovinos. Siendo menores a los encontrados por Li Olga (2005) que obtuvo el 100,00 % respectivamente, Vargas L. (2001) obtuvo valores de 93,80 % tanto para el VPP y VPN, en comparación a nuestro trabajo de investigación los resultados son menores a los encontrados, esto puede deberse a la prevalencia de la enfermedad que existe en la zona, el lugar de estudio, asimismo con la especie que están trabajando quienes utilizaron alpacas y equinos respectivamente.

Según Gorman Texia (1998) quien trabajó con bovinos halló un 78,00 % en cuanto al VPN, nuestros resultados son mayores a los obtenidos en este trabajo de investigación, esto posiblemente se deba a la prevalencia de la enfermedad que existe en la zona, estado del animal de estudio. Esta información nos indica que de cada 100 animales verdaderamente infestados por fasciola hepática, esta prueba de ELISA con Antígeno

semipurificado detecta a 81 animales, dato que se considera representativo por mostrar un porcentaje elevado frente a otras pruebas serológicas

Estudios realizados por Fredes Fernando (2003) que tuvo como material de estudio ovinos, tuvo valores de VPP de 100,00 % y VPN de 77,00 % esto debido a que trabajo con una proteína de 14 KDa, observando nuestros resultados son menores el VPP y mayores el VPN, esta diferencia puede deberse el lugar de estudio debido a la prevalencia de la enfermedad y la sensibilidad encontrada. Asimismo obtuvo valores en cuanto al VPP de 97,00% y VPN 96,00 % al utilizar una proteína de 29 KDa, comparando con el trabajo de investigación nuestros resultados son menores, esta diferencia posiblemente se deba a la presencia de la fasciolosis, calidad del antígeno, la especie utilizada ya que en nuestro trabajo de investigación se trabajó con alpacas.

CONTRASTE DE LA HIPÓTESIS

Para realizar el contraste de la hipótesis se trabajó con un intervalo de confianza al 95 %, siendo para la sensibilidad del kit de ELISA con antígeno semipurificado el resultado encontrado de 87,50 %, que al realizar la prueba estadística normal estandarizada (Z), se encuentra que el antígeno semipurificado producirá una sensibilidad mayor del 80,00 % por lo que se acepta la hipótesis. En lo que respecta a la especificidad el antígeno semipurificado producirá un valor de 86,84% que a la prueba normal estandarizada arroja un valor de 0,4291, por lo que de la misma forma se acepta la hipótesis ya que el valor encontrado es mayor al 85,00 %.

Por último se encontró: 80,77 % para el Valor Predictivo Positivo del antígeno semipurificado y 91,67 % para el Valor Predictivo Negativo, que a la prueba normal estandarizada nos da valores de: 0,1537 para el primero y 3,3237 para el segundo respectivamente, aceptándose así también la hipótesis ya que el valor encontrado es mayor al 80,00%.

En conclusión se acepta la hipótesis por lo que el kit de Elisa con antígeno semipurificado es efectivo en la detección de anticuerpos en el diagnóstico de fasciolosis de alpacas, ya que mostró un índice de validez de 87,10 %.

V. CONCLUSIONES.

De acuerdo a las condiciones del presente trabajo se concluye en lo siguiente:

1. La sensibilidad y especificidad para la prueba serológica de Elisa con antígeno semipurificado de la zona, fue de sensibilidad 87,50 % y una especificidad 86,84 % en alpacas.
2. El valor predictivo positivo y negativo del kit de Elisa con antígeno semipurificado fueron Valor Predictivo Positivo 80,77 % y Valor Predictivo Negativo 91,67 %.

VI. RECOMENDACIONES.

- 1.** Se recomienda realizar un trabajo de investigación con un antígeno purificado de la zona para el diagnóstico de la fasciolosis en alpacas.
- 2.** Se recomienda realizar un trabajo de investigación con este kit de ELISA con antígeno semipurificado haciendo una comparación con el examen coproparasitológico y examen post mortem para observar su sensibilidad y especificidad.
- 3.** Recomendamos que a partir de dicha investigación se puede realizar el diagnóstico para Fasciolosis en otras especies animales como bovinos, ovinos por ser un material existente de la zona.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

1. BUSTINZA V. 2001. La alpaca conocimiento del gran potencial andino, Instituto de investigación y promoción Camélidos Sudamericanos UNA-PUNO.
2. COLONA E. & ALZADORA L. 1995. Evaluación de antígenos de *Fasciola hepatica* por diferentes métodos inmunológicos en bovinos. inv. Sierra Central – Perú.
3. CURZEL M. 2001. Estudio sobre los factores de riesgo en la determinación de la fasciolosis, Art. Científico.
4. ESPEZÚA R. 2004. Los Camélidos Sudamericanos de los Andes. Primera Edición, Editorial Cadena del Sur – Puno-Perú. 2004.
5. ESPINO A, MILLÁN L, FINLA Y. 1987. Detection of antibodies and circulating excretory-secretory antigens for assesing cure of patients with fascioliasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 649
6. FERREIRA DE LA CUESTA G. 2003. Patología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Universidad de Antioquía. FMVZ-UNA.

7. FREDES F, Y COL. 2003. Evaluación Diagnóstica de dos Proteínas Purificadas de *Fasciola hepática* mediante ELISA en la Fasciolosis Ovina. Parasitología latinoamericana V.58 n.3-4 Santiago, Julio 2004.
8. GORMAN T, MORENO P, LORCA M. 1991. Inmunodiagnostico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunoenzimática (ELISA). Parasitología al día. 15:87-93.
9. GORMAN T, SANCHEZ R, FREDES F, Y ALCAINO H. 1998. Inmunodiagnóstico de fasciolosis bovina mediante elisa y western Blot.
10. GORMAN T, LÓPEZ C, Y COL. SANTIAGO 2000. Immunological Monitoring of Chemotherapeutic success in ovine fasciolosis using a semipurified antigen of < 30KDA. Parasitol al dia v.24n.1-2. Santiago 2000.
11. HILLYER, G. & SOLER DE GALANES, M. 1992. Identification of a 17- Kilodalton Fasciola hepatica immunodiagnostic antigen by the enzyme-linked immuno-electrotransfer blot technique. J. Clin. Microb. 26: 2048- 2053.
12. JAWETZ E, MELNICK L, ADELBERG A. 1985. Microbiología Médica. Undécima edición, editorial el manual moderno, SA de CV MEXICO D.F.

13. JEMLI M, ESCOULA L, MAGNAVAL J, DORCHIES P. 1992. Exploration de la réponse immunitaire chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. Revue Méd. Vét.; 143:355-360.
14. KHALIL G, ABDEL T, MAKLAD M, ABDALLAH H, FAHMY I, ELZAYYAT E. 1990. Specificity of crude and purified *Fasciola* antigen in immunodiagnosis of human fasciolosis. J. Egypt. Soc. Parasitol; 20:87-93.
15. LEGUÍA G. 1999. Enfermedades Parasitarias y Atlas Parasitológico de Camélidos Sudamericanos. Editorial del Mar EIRL. Lima-Perú.
16. LI O, LEGUÍA G, ESPINO A, DUMÉNIGO B, DIAZ A, OTERO O. 2005. Detección de Anticuerpos y Antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepática* en alpacas naturalmente infectadas. Revista Inv. Vet Perú 2005; 16.
17. M. ROITT I, 2003. Inmunología fundamentos. Editorial medica Panamericana. Bogotá
18. MARCO V, MARCOS L, TERASHIMA A, SAMALVIDES F, MIRANDA E, TANTALEAN G. 2001. "Comparación de Tres Técnicas de Concentración para el Diagnóstico de la Fase Crónica

- en la Infección por *Fasciola hepática*". IV CONGRESO PERUANO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES Lima-Perú.
19. NÁQUIRA C, SÁNCHEZ E, AYALA E, MEDINA S. 1999. "Diagnóstico Serológico de las Zoonosis Parasitarias" Instituto Nacional de Salud. Curso: Teorico-Practico. San Martín Perú.
20. NOEL A & SÁNCHEZ N. 2002. Sensibilidad y la Especificidad medidas obsoletas para determinar la bondad de una prueba diagnóstica, publicado en la Rev. Fac. Nac. Salud Pública: 20(1): 149-159
21. O. AVALOS, 2000. Pruebas Diagnósticas. Su aplicación en los estudios epidemiológicos. Nefrología volumen XX, número 5.
22. REINA M. 2003. Métodos en Biología Celular. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>.
23. ROJAS M. 1990. Parasitismo de los Rumiantes Domésticos, terapia, prevención y modelos para su aprendizaje. Primera edición. Editorial Majjosa. UNMSM- Lima-Perú. Pág. 371.
24. ROJAS M. 2004. Nosoparásitos de los Rumiantes Domésticos Peruanos. Segunda edición. Lima – Perú.
25. SOLÍS R. 1997. Producción de Camélidos Sudamericanos. Primera Edición, Imprenta Ríos S.A., Cerro de Pasco-Perú.

26. SOULSBY L. 1987. "Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos", 7° Edición, Editorial Interamericana. México.
27. VARGAS D. 2001. Implementación de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la Fasciolosis Equina. Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor. Casilla 234. Las Condes Santiago –Chile. 2001. Bol. chil. parasitol., Jul 2001, vol.56, no.3-4, p.91-94. ISSN 0365-9402

ANEXOS

ANEXO 1.

CAMAL MUNICIPAL DE AYAVIRI RESULTADOS A LA NECROPSIA Y ELISA

Alpaca	Necropsia	Elisa	Alpaca	Necropsia	Elisa	Alpaca	Necropsia	Elisa
1	Negativo	Negativo	22	Positivo	Positivo	43	Negativo	Positivo
2	Negativo	Negativo	23	Positivo	Positivo	44	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo	24	Positivo	Positivo	45	Positivo	Positivo
4	Negativo	Negativo	25	Positivo	Positivo	46	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	26	Positivo	Positivo	47	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	27	Negativo	Negativo	48	Negativo	Negativo
7	Negativo	Positivo	28	Negativo	Negativo	49	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo	29	Negativo	Negativo	50	Positivo	Positivo
9	Negativo	Negativo	30	Positivo	Positivo	51	Positivo	Positivo
10	Negativo	Negativo	31	Negativo	Negativo	52	Positivo	Positivo
11	Negativo	Negativo	32	Negativo	Negativo	53	Positivo	Positivo
12	Negativo	Negativo	33	Negativo	Negativo	54	Positivo	Negativo
13	Negativo	Negativo	34	Negativo	Negativo	55	Negativo	Negativo
14	Negativo	Positivo	35	Positivo	Positivo	56	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	36	Positivo	Positivo	57	Positivo	Positivo
16	Negativo	Negativo	37	Negativo	Negativo	58	Negativo	Negativo
17	Negativo	Positivo	38	Negativo	Negativo	59	Positivo	Positivo
18	Negativo	Positivo	39	Positivo	Negativo	60	Positivo	Positivo
19	Negativo	Negativo	40	Positivo	Positivo	61	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	41	Negativo	Negativo	62	Positivo	Positivo
21	Positivo	Positivo	42	Negativo	Negativo			

Fuente: Elaboración propia.

Se observa el número de animales muestreados a la necropsia separados por sexo y edad, así también se muestra los animales que a la necropsia resultaron positivos a la fasciolosis comparando con los resultados obtenidos al ELISA.

ANEXO 2: RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA PRUEBA DEL KIT ELISA ORIÓN

A	B	C	D	E	F	G	H
Control Negativo	7	15	23	31	39	47	55
Control Positivo	8	16	24	32	40	48	56
1	9	17	25	33	41	49	57
2	10	18	26	34	42	50	58
3	11	19	27	35	43	51	59
4	12	20	28	36	44	52	60
5	13	21	29	37	45	53	61
6	14	22	30	38	46	54	62

Fuente: Elaboración propia.

Una vez procesadas las 62 muestras con el Kit ELISA ORIÓN se obtuvo los siguientes resultados: 26 muestras REACTIVAS y 36 muestras NO REACTIVAS, observándose 26 muestras reactivas.

ANEXO 03: COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS AL ELISA Y RESULTADOS DE LA NECROPSIA PARA OBTENER DATOS DE VP, FP, FN Y VN

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Negativo	7	15	23	31		47	55
2	Positivo		16	24	32	40	48	56
3	1	9	17	25	33	41	49	57
4	2	10	18	26	34	42	50	58
5	3	11	19	27	35	43	51	59
6	4	12	20	28	36	44	52	60
7	5	13	21	29	37	45	53	61
8	6	14	22	30	38	46		62

VERDADERO POSITIVOS= 21	21,22,23,24,25,26,30,35,36,40,44,45,46,50,51,52,53,57,59,60,62
FALSO POSITIVO= 5	7,14,17,18,43
FALSO NEGATIVO= 3	8,39,54
VERDADERO NEGATIVO= 33	1,2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,15,16,19,20,27,28,29,31,32,33,34,37,38,41,42,47,48,49,55,56,58,61

Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo al realizar una comparación de los resultados obtenidos por el método ELISA y los resultados a la necropsia para obtener los valores de los VP, FP, FN Y VN. Teniendo los siguientes resultados: 21 muestras de VP, 5 muestras de FP, 3 muestras de FN y 33 muestras de VN.

ANEXO 04:

TABLA TETRACÓRICA

PRUEBA DIAGNÓSTICA	NECROPSIA		Total
	Enfermo	Sano	
ELISA			
Reactivo	21	5	26
No reactivo	3	33	36
Total	24	38	62

Empleando la tabla tetracórica con los datos obtenidos con el Kit ELISA y aplicando las fórmulas de Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN) se obtiene los siguientes resultados:

SENSIBILIDAD:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$Sensibilidad = \frac{21}{21+3}$$

$$Sensibilidad = 0,8750$$

$$Sensibilidad = 87,50\%$$

ESPECIFICIDAD:

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$Especificidad = \frac{33}{33+5}$$

$$Especificidad = 0,8684$$

$$Especificidad = 86,84\%$$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPP = \frac{21}{21 + 5}$$

$$VPP = 0,8077$$

$$VPP = 80,77\%$$

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

$$VPN = \frac{33}{33 + 3}$$

$$VPN = 0,9167$$

$$VPN = 91,67\%$$

ANEXO 05. CUADRO ESTADISTICO DE EXCEL UTILIZANDO EL IC

	p	q	Lim. Inferior	Lim. Superior	Hipótesis nula	Z ₀	Z _t	
<i>Sensibilidad</i>	0.8750	0.1250	79.2677	95.7323	mayor a 0,80	1.7857	-1.64485363	Aceptamos H ₀
<i>Especificidad</i>	0.8684	0.1316	78.4278	95.2564	mayor a 0,85	0.4291	-1.64485363	Aceptamos H ₀
<i>VPP</i>	0.8077	0.1923	70.9589	90.5795	mayor a 0,80	0.1537	-1.64485363	Aceptamos H ₀
<i>VPN</i>	0.9167	0.0833	84.7869	98.5465	mayor a 0,80	3.3237	-1.64485363	Aceptamos H ₀

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 06. Prueba de hipótesis

Sensibilidad

1. Formulación

H_0 : El antígeno semipurificado producirá una sensibilidad mayor al 80,00 %

H_1 : El antígeno semipurificado no producirá una sensibilidad mayor al 80,00 %.

2. Prueba Normal estandarizada (Z)

3. Estadística prueba

$$Z_0 = \frac{P - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.8750 - 0.80}{\sqrt{\frac{(0.8750)(0.1250)}{62}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.075}{0.042}$$

$$Z_0 = 1.7857$$

$$Z_t = -1.645$$

4. Contrastación

Si $Z_0 \geq Z_t$, se acepta la H_0 y rechazamos la H_1

Si $Z_0 \leq Z_t$, se rechaza la H_0 .

5. Decisión

Aceptamos la H_0 .

6. Conclusión

El antígeno semipurificado producirá una sensibilidad mayor al 80,00%

Especificidad

1. Formulación

H_0 : El antígeno semipurificado producirá una especificidad mayor al 85,00 %

H_1 : El antígeno semipurificado no producirá una especificidad mayor al 85,00 %.

2. Prueba Normal estandarizada (Z)

3. Estadística prueba

$$Z_0 = \frac{P - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.8684 - 0.85}{\sqrt{\frac{(0.8684)(0.1316)}{62}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.0184}{0.0429}$$

$$Z_0 = 0.4291$$

$$Z_t = -1.645$$

4. Contrastación

Si $Z_0 \geq Z_t$, se acepta la H_0 y rechazamos la H_1

Si $Z_0 \leq Z_t$, se rechaza la H_0 .

5. Decisión

Aceptamos la H_0 .

6. Conclusión

El antígeno semipurificado producirá una sensibilidad mayor al 85,00%

Valor predictivo positivo

1. Formulación

H_0 : El antígeno semipurificado producirá un Valor predictivo positivo mayor al 80,00 %

H_1 : El antígeno semipurificado no producirá un Valor predictivo positivo mayor al 80,00 %.

2. Prueba Normal estandarizada (Z)

3. Estadística prueba

$$Z_0 = \frac{P - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.8077 - 0.80}{\sqrt{\frac{(0.8077)(0.1923)}{62}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.0077}{0.0501}$$

$$Z_0 = 0.1537$$

$$Z_t = -1.645$$

4. Contrastación

Si $Z_0 \geq Z_t$, se acepta la H_0 y rechazamos la H_1

Si $Z_0 \leq Z_t$, se rechaza la H_0 .

5. Decisión

Aceptamos la H_0

6. Conclusión

El antígeno semipurificado producirá un Valor Predictivo Positivo mayor al 80,00%

Valor predictivo negativo

1. Formulación

H_0 : El antígeno semipurificado producirá un Valor Predictivo Negativo mayor al 80,00 %

H_1 : El antígeno semipurificado no producirá un Valor Predictivo Negativo mayor al 80,00 %.

2. Prueba Normal estandarizada (Z)

3. Estadística prueba

$$Z_0 = \frac{P - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.9167 - 0.80}{\sqrt{\frac{(0.9167)(0.0833)}{62}}}$$

$$Z_0 = \frac{0.1167}{0.0351}$$

$$Z_0 = 3.3237$$

$$Z_t = -1.645$$

4. Contrastación

Si $Z_0 \geq Z_t$, se acepta la H_0 y rechazamos la H_1

Si $Z_0 \leq Z_t$, se rechaza la H_0 .

5. Decisión

Aceptamos la H_0 .

6. Conclusión

El antígeno semipurificado producirá Valor Predictivo Negativo mayor al 80,00 %.



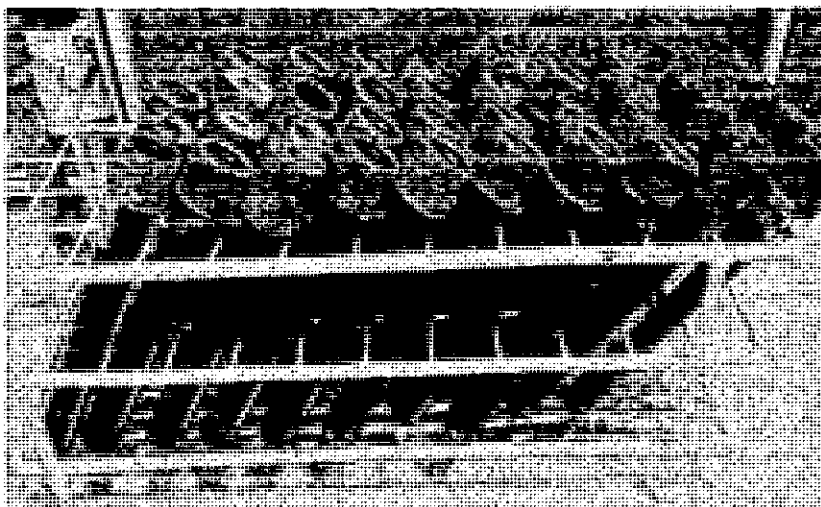
Fuente: Elaboración propia.

Foto 1. Material biológico utilizado para la realización del trabajo de investigación.



Fuente: Elaboración propia.

Foto 2. Extracción de muestras sanguíneas a cada alpaca.



Fuente: Elaboración propia.

Foto 3. Muestras sanguíneas extraídas a las 62 alpacas.



Fuente: Elaboración propia.

Foto 4. Realización de los cortes del hígado de alpaca para su inspección y observación de presencia de fasciolas.



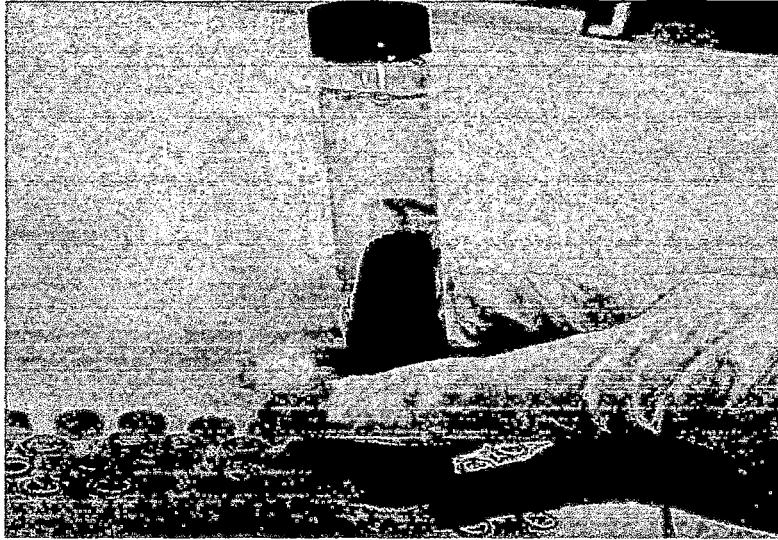
Fuente: Elaboración propia.

Foto 5. Fasciola hepática presente en el hígado de alpaca.



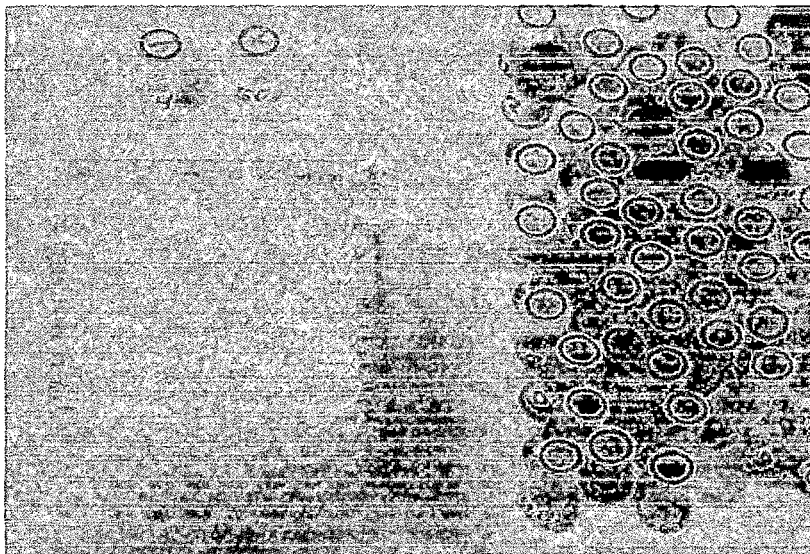
Fuente: Elaboración propia.

Foto 6. Centrifugación de las muestras sanguíneas para la obtención del suero.



Fuente: Elaboración propia.

Foto 7. Suero sanguíneo obtenido luego de la centrifugación.



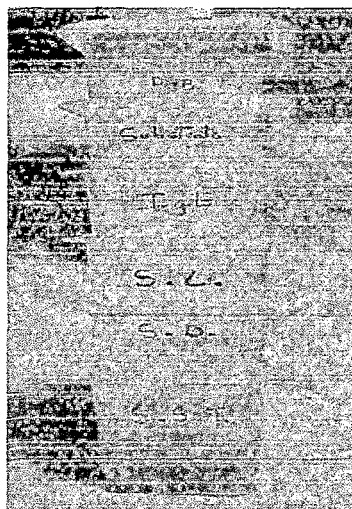
Fuente: Elaboración propia.

Foto 8. SC positivos y negativos, asimismo de los sueros problemas y placa de microtitulación.



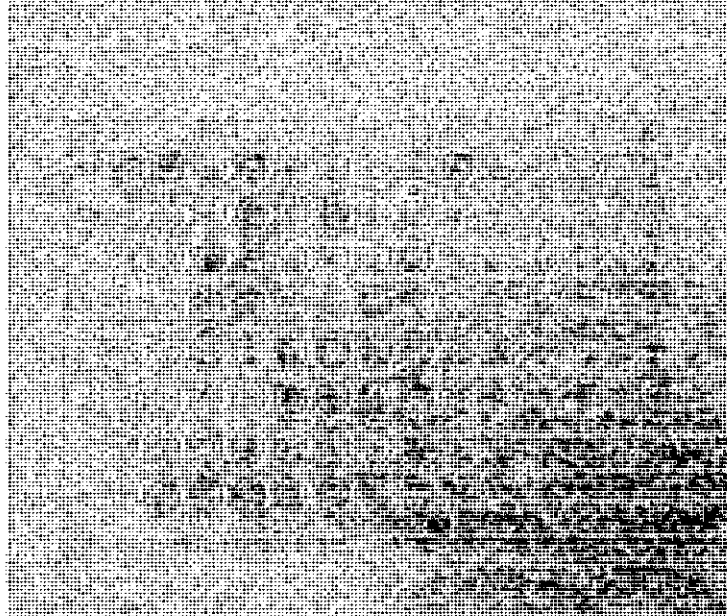
Fuente: Elaboración propia.

Foto 9. Antígeno de fasciola de Bovino.



Fuente: Elaboración propia.

Foto 10. Kit de ELISA con antígeno semipurificado.



Fuente: Elaboración propia.

Foto 11. Vista fotográfica de la placa de microtitulación con los resultados obtenidos al espectrofotometro.