

Diagnóstico Inmunológico de la Equinococcosis Ovina

¹Gatti, A., ²Alvarez, A. R., ¹Araya, D., ¹Herrero, E., ¹Costa, M. T., ¹Mancini, S.,
³Santillan, G., ²Larrieu, E.

¹Ministerio de Salud, Provincia de Río Negro, Argentina. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPampa, Argentina. Instituto Nacional de Microbiología “Carlos Malbrán”, Buenos Aires, Argentina.

e- mail: elarrieu@salud.rionegro.gov.ar

RESUMEN

El inmunodiagnóstico en el ovino presenta problemas de sensibilidad y especificidad que limitan su aplicación en sistemas de vigilancia de la enfermedad. El Objetivo del trabajo fue desarrollar una técnica sensible, específica y económica para el diagnóstico de la equinococcosis quística en ovinos naturalmente infectados y evaluar la validez de la necropsia como prueba de referencia. 247 ovinos fueron estudiados en sala de faena confirmándose los diagnósticos parasitológicos mediante histología. Los sueros obtenidos fueron procesados mediante enzimo inmuno ensayo con tres preparaciones antigénicas: LHT (líquido hidatídico total), S2B (fracción purificada de LHT) y B y confirmados mediante western blot. EIE con las tres preparaciones antigénicas fue eficaz para discriminar *E. granulosus* de *Cisticercos tenuícolis* y *Taenia* spp. Sueros de ovinos negativos macroscópicamente resultaron reactivos a EIE y positivos a WB. La sensibilidad fue de 89.2% para LHT, 80.0% para S2B y 86.4% para B. La especificidad fue del 89.5% para LHT, 93.9% para S2B y 92.8% para B en el total de la majada. La sensibilidad en corderos resultó de 78.6 con LHT, 75.0 con S2B y 64.3 con B. El diagnóstico macroscópico en sala de faena demostró tener limitaciones como prueba de referencia para el inmunodiagnóstico de la equinococcosis quística en el ovino, resultando necesario incluir histología y WB como pruebas de referencia. EIE resultó una técnica con sensibilidad y especificidad adecuadas para su uso en sistemas de vigilancia y evaluación de programas de control, resultando LHT la preparación antigénica de mayor valor.

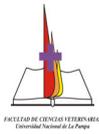
Palabras Claves: equinococcosis quística, ovinos, inmunodiagnóstico, enzimo inmuno ensayo.

INTRODUCCIÓN

EQUINOCOCCOSIS QUÍSTICA es una zoonosis parasitaria producida por un endoparásito perteneciente al Phylum Platyhelminthes, Clase Cestoda, familia Taeniidae, género *Echinococcus*, especie *granulosus*.

Requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida. Un hospedero definitivo, (carnívoros, especialmente el perro) donde se desarrolla la faz adulta o estrobilar y un hospedero intermediario (ungulados, especialmente el ovino) en donde se desarrolla la faz larvaria o metacestode (Thompson and Mac Manus, 2001).

La información sobre inmunodiagnóstico en el ovino es limitada. Se ha intentado el uso de la hemaglutinación indirecta (Yong et al., 1978, Conder et al., 1980, Bakos et al., 1985), doble difusión cinco (Yong et al., 1979, Conder et al., 1980) y enzimo inmuno ensayo (Craig y Richard, 1981, Yong et al., 1984, Lightowlers et al., 1984, Ming, 1986,



Lloyd et al., 1991) con escaso éxito en tanto ninguna de estas experiencias logró sistematizar ninguna prueba serológica para el ganado (Craig, 1997).

Se ha señalado que las principales limitaciones para el inmunodiagnóstico en el ovino son las reacciones cruzadas con otras tenias (forma larval de *Taenia hydatigena* y forma larval de *Taenia ovis*), presencia de falsos positivos y baja sensibilidad (Lightowlers et al., 1995, Craig, 1997, Eckert et al., 2001).

La necropsia es utilizada como prueba diagnóstica de elección (Eckert et al., 2001) siendo también empleada como prueba de referencia para estimar sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunodiagnósticas.

El desarrollo de pruebas de tamizaje podría ser de especial interés para identificar animales portadores de quistes hidatídicos cuando se importan ovinos desde áreas endémicas a áreas libres de infección (Craig, 1997, Eckert et al., 2001), para identificar establecimientos ganaderos con focos de transmisión en los programas de control o como sistema de vigilancia epidemiológica para evaluar la prevalencia de la infección.

Por ello, los objetivos del presente trabajo son desarrollar una técnica inmunodiagnóstica de tamizaje sensible, específica y de ejecución sencilla y evaluar la eficiencia de la necropsia como prueba de referencia para las pruebas inmunodiagnósticas.

MATERIALES Y METODOS

Población y área de trabajo

Se trabajó con ovinos en el momento de ser faenados (animales naturalmente infectados) en 5 salas de faena de la Provincia de Río Negro, en donde la prevalencia de infección en ovinos es del 18% (Larrieu et al., 2001).

Fueron clasificados en función de la edad en corderos (0 a 6 meses), borregos (7 a 23 meses) y adultos (24 meses y más)

Se estudiaron en total 247 animales, de los cuales 85 (34.4%) correspondieron a corderos, 60 (24.3%) a borregos y 102 (41.3%) a adultos 176 (71.3%) resultaron machos y 71 (28.7%) hembras.

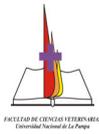
Se recolectaron muestras de sangre en tubos plásticos descartables, obteniéndose 10 cc de sangre en forma directa de la vena yugular en el momento del sacrificio. Los tubos fueron rotulados con el número de identificación utilizado para la identificación del animal.

El suero se extrajo mediante centrifugación y se conservó refrigerado a 5°/8° hasta su remisión a laboratorio antes de las 48 hs., en donde se mantuvieron a -20° hasta su procesado.

Prueba de enzimo inmuno ensayo (EIE)

Se desarrolló como prueba tamiz la técnica de EIE utilizando tres diferentes tipos de antígenos: líquido hidatídico total (LHT) obtenido según técnica de Coltorti (1986), antígeno S2B obtenido según técnica de Coltorti et al. (1990) y antígeno B obtenido según técnica de Oriol (1971). Los antígenos fueron provistos por el Instituto Nacional de Microbiología "Carlos Malbrán".

Para la prueba de enzimo inmuno ensayo con antígeno LHT (EIE.LHT) cada vial de antígeno se reconstituyó con el volumen adecuado de buffer de sensibilización (carbonato/bicarbonato, ph 9.6) a concentración de proteínas óptima, determinado por el método de Bradford (1976).



Las placas (micro strips) se sensibilizaron utilizando una concentración de antígeno de 1 microgramo/pocillo. En cada pocillo se sembraron 50 microlitros de antígeno diluido. Se mantuvieron 18 horas en cámara húmeda y se lavó 3 veces cada vez 4 minutos con buffer de lavado (PBS Tween 0.3%).

Se agregó a cada pocillo 100 microlitros del suero diluido 1/800 en PBS-Leche 3%-Tween 0.3% y se dejó 45 minutos a 37°. Se aspiró el contenido y se lavó con buffer de lavado 3 veces. Se sembraron 100 microlitros de conjugado antigamaglobulina ovina marcada con peroxidasa diluida 1/2500 en solución PBS-Leche 3%-Tween 0.3%. Se incubaron 45 minutos a 37°. Se aspiró el contenido y se lavó con buffer de lavado tres veces.

Como substrato revelador se utilizó 100 microlitros de ABTS en solución líquida (Sigma MR). Se incubaron 45 minutos a 37° y se agregaron 100 microlitros de solución de frenado (SDS 1%).

Como testigo positivo se utilizó suero ovino con hidatidosis confirmado por histología. Como testigo negativo se utilizó suero ovino sin hidatidosis, cisticercosis y teniasis intestinal. Se definió la dilución óptima de los sueros testigos y problema por titulación (diluciones seriadas del antisuero y del conjugado hasta obtener la máxima dilución que permita diferenciar muestras controles positivo alto, positivo bajo y negativo, utilizándose el mismo protocolo que para la técnica). Se sembraron los sueros testigos y problema. Cada suero se procesó por duplicado. En cada microplaca se incluyeron 3 sueros negativos y 1 positivo.

Las lecturas se efectuaron en un lector vertical de placas con filtro a 405 nm.

El valor de corte se determinó mediante curvas ROC (receiver operating characteristic) mediante planilla Excel según diseño de Graeiner (1995).

Para enzimo inmuno ensayo con antígeno S2B (EIE.S2B). Cada vial de antígeno se reconstituyó con el volumen adecuado de buffer de sensibilización (PBS 7.2), las placas (micro strips) se sensibilizaron utilizando una concentración de antígeno de 0.15 microgramo/pocillo). El suero fue diluido 1/400. Para enzimo inmuno ensayo con antígeno B (EIE.B), finalmente, cada vial de antígeno se reconstituyó con el volumen adecuado de buffer de sensibilización (PBS 7.2). Las placas (micro strips) se sensibilizaron utilizando una concentración de antígeno de 0.10 microgramo/pocillo. El suero fue diluido 1/400. Sueros testigo, sembrado en placa, lectura y estimación del valor de corte se aplicó en igual forma que con LHT.

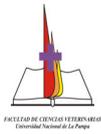
Pruebas de referencia

Como prueba patrón se utilizó el diagnóstico macroscópico en sala de faena con confirmación de positivos mediante estudios microscópicos y el diagnóstico inmunológico mediante Western Blot (WB).

Para ello, en sala de faena los ovinos seleccionados fueron inspeccionados a los efectos de determinar la presencia de *Echinococcus granulosus*, *Cisticercus tenuicollis* (forma larval de *Taenia hydatigena*), *Cisticercus ovis* (forma larval de *Taenia ovis*) y *Taenia* spp (tenias intestinales).

Se procedió a revisar visualmente y por palpación hígado, pulmón, corazón, riñón, y epiplones; se efectuaron cortes en las mismas vísceras para detectar quistes intraparenquimatosos y se efectuó palpación y cortes en músculo masetero. Finalmente se procedió a la apertura longitudinal de intestino delgado.

En sala de faena se extrajeron 26 muestras compatibles con hidatidosis y/o formas quísticas de parásitos no características al diagnóstico macroscópico para su confirmación histológica, siendo conservadas en formol al 5% hasta su remisión a laboratorio.



Fueron estudiadas con la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (Jubb y Kennedy, 1993). En los casos en que se presentaron quistes calcificados y/o contaminados, se complementó con la técnica de tinción de PAS (Jubb y Kennedy, 1993).

Los ovinos que resultaron positivos a la prueba tamiz y negativos al diagnóstico macroscópico fueron estudiados mediante la técnica de WB. Para ello se efectuó la separación de proteínas mediante SDS-Page (Laemli, 1970) utilizándose gel de poliacrilamida de 0.75 mm de espesor, en una cuba Mini Protean II de Bio Rad. En cada calle se sembraron las muestras problema, un control positivo y uno negativo. La corrida se realizó a 200V, 60 mA y 30W durante aproximadamente 1 hora.

La transferencia a nitrocelulosa se efectuó en buffer correspondiente 1 hora a 100V, 250 mA, 60 W.

La reacción inmunoenzimática se efectuó mediante bloqueo de la nitrocelulosa con PBS Tween 0.5% leche con agitación suave durante 1 hora, agregado de suero de las ovejas diluido 1/100, incubación de una hora con agitación suave y lavado tres veces con PBS tween 0.5%, incubación con conjugado anti IgG anti oveja conjugado con peroxidasa, lavado con PBS Tween 0.5% y revelado con DAB.

Se clasificaron como positivas las muestras que presentaron bandas de precipitación de antígeno 5 (52-67 kd) o de antígeno B (8-12, 16 y 24 Kd).

Finalmente se efectuó un análisis bibliográfico comparativo de ovinos EIE positivos que resultaron negativos al examen macroscópico en sala de faena a distintas prevalencias esperadas en la majada ovina.

Estimación de sensibilidad y especificidad del Enzimo inmuno ensayo

Se calculó la sensibilidad y especificidad con sus correspondientes Intervalos de Confianza del 95% para cada uno de los grupos de edad (corderos, borregos, adultos) y para cada una de las preparaciones antigénicas (LHT, S2B y B).

El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo se estimó para una prevalencia esperada del 18%.

Se utilizó el software Epidat 3.0 (Xunta de Galicia – OPS/OMS).

RESULTADOS

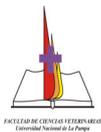
Diagnóstico inmunológico mediante EIE

Considerando el diagnóstico confirmado mediante histología como prueba patrón los valores de corte, considerando las densidades ópticas de los 247 ovinos estudiados, resultaron 0.200 (IC95% 0.18-0.23) para EIE.LTH, 0.106 (IC95% 0.10-0.12) para EIE.S2B y 0.078 (IC95% 0.074-0.087) para EIE.B.

Incorporando a WB como prueba patrón, los valores de corte mediante análisis ROC resultaron 0.157 (IC95% 0.137-0.166) para EIE.LTH, 0.073 (IC95% 0.068-0.082) para EIE.S2B y 0.068 (IC95% 0.039-0.077) para EIE.B.

Con el valor de corte DO 0.157 fueron clasificados por EIE.LHT 77 ovinos positivos y 170 negativos, mientras que con el valor de corte 0.200 resultaron 61 ovinos positivos y 186 negativos.

Con DO 0.200, 1 ovino macroscópicamente negativo a *E. granulosus* con forma larval de *T. hydatigena* resultó clasificado como positivo a EIE.LHT/WB. Con DO 0.157, 5 ovinos positivos a forma larval de *T. hydatigena* resultaron clasificados como positivos a *E. granulosus*.



Con DO 0.200 6 ovinos clasificados macroscópicamente como negativos a *E. granulosus* y a otras parasitosis, resultaron positivos a EIE.LHT mientras que con DO 0.157 resultaron positivos 19.

Con el valor de corte DO 0.073 fueron clasificados por EIE.S2B 63 ovinos positivos y 184 negativos, mientras que con el valor de corte DO 0.106 resultaron 42 ovinos positivos y 198 negativos.

Con DO 0.106 ningún ovino clasificado macroscópicamente como negativo a *E. granulosus* con *Taenia* spp. o forma larval de *T. hydatigena* resultó clasificado como positivo a EIE.S2B. Con DO 0.073 un ovino clasificado macroscópicamente como negativo a *E. granulosus* con forma larval de *T. hydatigena* resultó clasificado como positivo a EIE.S2B.

Con DO 0.106 un ovino clasificado macroscópicamente como negativos a *E. granulosus* resultó positivo a EIE.S2B mientras que con DO 0.073 resultaron positivos 11.

Con el valor de corte DO 0.068 fueron clasificados por EIE.B 66 ovinos positivos y 181 negativos, mientras que con el valor de corte 0.078 resultaron 61 ovinos positivos y 186 negativos.

Con el valor de corte 0.078 ningún ovino macroscópicamente negativo a *E. granulosus* con *Taenia* spp. o forma larval de *T. hydatigena* resultó clasificado como positivo a EIE.B, mientras que con el valor de corte DO 0.068 un ovino con *Taenia* spp. y uno con forma larval de *T. hydatigena* resultaron clasificados como positivos a EIE.B.

Con DO 0.078 5 ovinos clasificados macroscópicamente como negativos a *E. granulosus* resultaron positivos a EIE.B/WB, mientras que con DO 0.068 9 resultaron positivos.

Las relaciones entre EIE negativos y positivos y resultados negativos y positivos a la prueba patrón se presentan en Tabla 1. En la Figura 1 se observan las densidades ópticas en ovinos negativos y positivos a distintas parasitosis y su posición en relación al valor de corte, mientras que la distribución de las absorbancias para ovinos clasificados como positivos y negativos a *E. granulosus* se presenta en Figura 2.

La prueba de Kappa global comparando las tres preparaciones antigénicas resultó del 0.83, resultando las diferencias entre cada una de las Kappa, no significativas (Prueba de Chi cuadrado de homogeneidad de Kappa p: 0.47).

Prueba de referencia

Se diagnosticó en forma presuntiva la presencia de *Echinococcus granulosus* en 44 (17.8%) ovinos, forma larval de *Taenia hydatigena* en 18 (7.3%) y *Taenia* spp en intestino en 11 (4.5%). Resultaron con diagnóstico negativo 174 (70.4%) ovinos. No se diagnosticó ningún caso de *Taenia ovis*.

En el grupo de animales con *E. granulosus* (44), en 3 (6.8%) también se diagnosticó la forma larval de *Taenia hydatigena* y en 4 (9.1%) *Taenia* spp.

Sobre un total de 26 muestras remitidas a laboratorio 1 (3.8%) con diagnóstico presuntivo de echinococcosis fue descartada (diagnóstico definitivo linfadenitis caseosa) y 22 (84.6%) confirmadas. Tres (11.5%) con diagnóstico presuntivo de quiste no echinococcosis fueron clasificadas como echinococcosis (2 quistes complicados, 1 quiste calcificado), encontrándose en uno de los casos oncosferas vivas de *E. granulosus* en hígado. En total se observaron un 15.4% de modificaciones al diagnóstico presuntivo.

En los animales con diagnóstico definitivo de equinococcosis se identificaron 140 quistes (promedio 3.1 quistes por animal).

La localización de los quistes de *E. granulosus* confirmadas resultaron hígado 17 (37.8%), pulmón 11 (24.4%), hígado y pulmón simultáneamente 17 (37.8%). Con



relación al sexo, resultaron con *E. granulosus* 19 (28.8%) hembras y 26 (15.2%) machos, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p: 0.02$). Se observó un aumento significativo de la prevalencia en función de la edad (Chi cuadrado para tendencia lineal $p: 0.0007$, OR para categoría adulto 4.4).

Se efectuaron en total 24 WB, resultando 20 (83.3%) positivos y 4 (26.7%) negativos. De los ovinos que resultaron macroscópicamente negativos a echinococcosis y a otras parasitosis en sala de faena y que presentaban títulos a EIE.LHT superiores al valor de corte 16 (80%) fueron clasificados como positivos y 4 (20%) resultaron negativos.

Un (100%) ovino clasificado como negativo a *E. granulosus* en sala de faena y positivo a *Taenia* spp. que presentaba título a EIE.LHT superior al valor de corte fue clasificado como positivo por WB.

Finalmente, 3 (100%) ovinos clasificados macroscópicamente negativos a echinococcosis en sala de faena, que presentaban títulos a EIE.LHT inferiores al valor de corte, pero superiores al valor de corte para EIE.B fueron clasificados como positivos por WB.

Considerando como prueba patrón el diagnóstico histológico y WB resultaron clasificados definitivamente como positivos a *E. granulosus* 65 (26.3%) ovinos, siendo 182 (73.7%) clasificados como negativos.

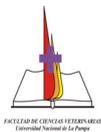
Se efectuó un análisis de ANOVA a los efectos de comparar las medias de las densidades ópticas en cinco grupos de animales: ovinos negativos en sala de faena y positivos a WB (grupo 1), ovinos con *E. granulosus* identificado en sala de faena/histología y EIE.LHT positivos (grupo 2), ovinos negativos en sala de faena y a EIE.LHT (grupo 3), ovinos con forma larval de *T. hydatigena* (grupo 4) y ovinos con *Taenia* spp intestinal (grupo 5), resultando las diferencias estadísticamente significativas (para F: 17.1 $p: 0.00$). Asimismo, se efectuaron comparaciones individuales mediante la prueba de DMS protegida de Fischer, no encontrándose diferencias estadísticas entre los grupos 3, 4 y 5 ($p > 0.05$), mientras que resultaron estadísticamente significativas las diferencias entre el grupo 2 y el grupo 3 ($p: 0.00$), entre los grupos 1 y 2 ($p: 0.046$) y entre el grupo 2 y el grupo 4 ($P: 0.0001$). Un resumen de los resultados de la prueba de ANOVA/DMS se presenta en Tabla 2 y Figura 3.

En el análisis comparativo de ovinos EIE positivos que resultaron negativos al examen macroscópico se observó que al aumentar la prevalencia de la infección en la majada aumenta proporcionalmente la tasa de animales EIE positivos macroscópicamente negativos, resultando esta tendencia estadísticamente significativa. (Chi Cuadrado de tendencia lineal $p: 0.00$). (Tabla 4).

Pruebas diagnósticas simples y análisis ROC

Utilizando histología como prueba patrón S2B resultó la preparación antigénica que presentó una mayor sensibilidad tanto para el total de la majada (82.2) como para corderos (62.5). Incorporando WB como prueba patrón LHT resultó la preparación antigénica de mayor sensibilidad en el total de la majada (84.6-89.2) y en corderos (78.6 con los dos niveles de corte). En todos los casos las pruebas resultaron más sensibles a mayor edad de los animales. (Tabla 4).

Con relación a la especificidad, S2B resultó la preparación antigénica que presentó una mayor especificidad para el inmunodiagnóstico de la equinococcosis ovina utilizando histología como prueba patrón tanto en majada (94.1) como en corderos (96.1). Con WB como prueba patrón, también resultó S2B la preparación antigénica de mayor especificidad tanto en majada (99.4-93.9) como en corderos (100-92.9). No se observaron modificaciones en la especificidad a mayor edad de los animales. (Tabla 5).



El valor predictivo positivo (para una prevalencia esperada del 18%), fue mayor para S2B con histología como prueba patrón (75.3) y también con WB como prueba patrón (96.4-74.2). El valor predictivo negativo, por su parte, fue mayor para S2B con histología como prueba patrón (96.0) y mayor para LHT con WB como prueba patrón (96.2-97.7). (Tabla 6).

LHT presentó la mayor capacidad discriminativa, estimando el área bajo la curva ROC (0.930 IC95% 0.86-0.97). La comparación de las áreas bajo la curva ROC entre las tres preparaciones antigénicas, resultaron no significativas (prueba de homogeneidad de Chi cuadrado (p: 0.07).

DISCUSION

Pruebas de tamizaje para el diagnóstico de la equinococcosis quística en el ovino

En la presente experiencia, EIE con las 3 preparaciones antigénicas resultó eficaz para discriminar ovinos con *E. granulosus* de ovinos portadores de otras parasitosis (forma larval de *Taenia hydatigena* y tenias intestinales). Seleccionando mediante análisis ROC un valor de corte para máxima especificidad, con LHT solo un ovino con forma larval de *Taenia hydatigena* resultó clasificado como positivo a equinococcosis, mientras que con antígeno S2B y B ninguno fue incorrectamente clasificado. Al aplicarse un valor de corte para maximizar sensibilidad S2B clasificó sólo 1 ovino como falso positivo, 2 ovinos el antígeno B y 5 ovinos LHT.

Con las 3 preparaciones antigénicas se encontraron ovinos con serología por encima del valor de corte que resultaron negativos al diagnóstico en sala de faena (posibles falsos positivos). Sin embargo, la mayor parte de estos ovinos resultaron positivos a la técnica de Western Blot utilizada como prueba patrón (80.9% utilizando LHT, 91.7% utilizando S2B y 94.7% con B).

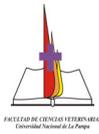
La mayor capacidad discriminativa entre animales positivos y negativos, estimada como área bajo la curva ROC, fue hallada con antígeno LHT aunque las diferencias entre las tres preparaciones antigénicas fueron estadísticamente no significativas ($p > 0.05$). En igual forma, la prueba global de Kappa resultó estadísticamente no significativa ($p > 0.05$) y las estimaciones de concordancia bruta, asimismo, resultaron altas en todas las combinaciones posibles (0.93-0.95), corroborando las limitadas diferencias entre los 3 antígenos.

El antígeno total (LHT), obtenido de líquido hidatídico ovino resultó la preparación antigénica de mayor sensibilidad (89.2%-77.8%, según el valor de corte) mientras que la mayor especificidad se alcanzó con antígeno S2B (93.9%-99.4%, según el valor de corte).

Para la prevalencia esperada en la Provincia de Río Negro, el mayor valor predictivo positivo se logró con antígeno S2B (96.4%) y el mayor valor predictivo negativo con LHT (97.5%).

Un análisis global de estos resultados muestra que tanto LHT como S2B podrían ser utilizados indistintamente como antígenos para el diagnóstico de la equinococcosis quística, aunque la mayor facilidad de producción y disponibilidad de antígeno LHT parece recomendarlo como antígeno de elección. Antígeno B, por su parte, resulta de uso menos recomendable.

En relación a corderos el antígeno total (LHT) también resultó el más sensible (78.6%) y S2B el más específico (100%). Estos resultados son especialmente valiosos para la posible aplicación del inmunodiagnóstico en programas de vigilancia epidemiológica de la enfermedad, en tanto la identificación de transmisión en el pasado reciente (expresada



como infección en animales jóvenes) es uno de los componentes fundamentales del programa de control.

El hallazgo histológico en ovinos naturalmente infectados de oncósferas de *E. granulosus* en hígado, negativos al examen macroscópico y positivos al inmunodiagnóstico, confirman las ventajas de sensibilidad del enzimo inmuno ensayo en relación al diagnóstico en sala de faena utilizado hasta el presente para identificar infecciones recientes.

Analizados los presentes resultados en relación a experiencias previas, debe considerarse que inicialmente Yong y col en 1984, utilizando antígenos nativos de líquido hidatídico ovino habían alcanzado con EIE, en animales experimentalmente infectados con diversos cestodes, una sensibilidad y especificidad de solo 32%-65% respectivamente, resultando por ende una prueba no recomendable para su aplicación específica en programas de vigilancia de la equinococosis quística.

Ibrahim et al. (1996) lograron una sensibilidad y especificidad con antígenos de líquido hidatídico ovino de 36%-93% respectivamente y con antígenos de líquido hidatídico de camello de 71%-96%, Vargas et al. (2002) con antígeno de líquido hidatídico ovino 83%-75% y Kittelberger et al. (2002) con antígeno de protoescólcies 64.6%-95%. En todos los casos la sensibilidad y especificidad de EIE alcanzada en la presente experiencia es superior.

Utilizando antígeno B, por su parte, Ibrahim et al. (1996) lograron una sensibilidad y especificidad con antígeno de oveja de 57%-93% y con antígeno de camello de 90%-99%; Kittelberger et al. (2002) con antígeno B de líquido hidatídico ovino 9.7%-99.5%, mientras que en nuestro trabajo antígeno B, según el valor de corte, presentó una sensibilidad de 84.5%/86.4% y una especificidad de 97.2%/96.8%.

Así, en el presente trabajo EIE resultó una técnica específica y sensible para identificar transmisión de *Echinococcus granulosus* del perro al ovino, incluso en corderos, resultando posible su aplicación en el diagnóstico de la equinococosis quística en el ovino.

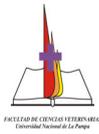
LHT parece resultar el antígeno de elección por su facilidad de producción y disponibilidad.

Pruebas de referencia para el diagnóstico serológico de la equinococosis ovina

En el presente trabajo se demuestra que el 15.4% de los diagnósticos presuntivos macroscópicos efectuados en sala de faena fueron modificados por los estudios histológicos de confirmación, detectándose diagnósticos falsos positivos y falsos negativos en todos los grupos de edad estudiados.

Estos resultados confirman estudios previos efectuados en la Provincia de Río Negro (Larrieu et al., 2001) que identificaban en sala de faena 37.2% de diagnósticos falsos positivos dados por granulomas inespecíficos, pseudo tuberculosis, enfisema y degeneración grasa y 1.1% de diagnósticos falsos negativos dados por pequeños quistes intraparenquimatosos; y coinciden con estudios efectuados en Uruguay (Cabrera et al., 1996) que notificaron un 26.1% de ovinos clasificados como positivos en sala de faena que resultaron no hidatídicos al estudio histológico siendo linfadenitis caseosa, *Cisticercus tenuicollis*, mancha blanca y abscesos las patologías confundentes, señalando asimismo que quistes pequeños e intraparenquimatosos, especialmente en pulmón, pueden pasar fácilmente desapercibidos a la inspección sanitaria resultando clasificados como falsos negativos en sala de faena.

En el presente estudio, se identificaron mediante histología oncósferas intraparenquimatosas y quistes de desarrollo incipiente, negativos a la inspección macroscópica (falsos negativos a sala de faena).



Estos resultados confirman las limitaciones del diagnóstico macroscópico en sala de faena y la validez de los estudios histológicos para su aplicación como pruebas de referencia para el diagnóstico de la equinococcosis quística en el ovino.

Los estudios efectuados para determinar sensibilidad y especificidad del diagnóstico inmunológico de la equinococcosis quística en ovinos natural o experimentalmente infectados han considerado, sin embargo, casi exclusivamente paneles de sueros en donde la clasificación de un animal como positivo o negativo se basó en el análisis macroscópico en sala de faena (Conder et al., 1980, Craig et al., 1981, Yong et al., 1984, Bakos et al., 1985, Lightowlers et al., 1984, Ibrahem et al., 1996, Moro et al., 1997, Moro et al., 1999, Kittelberger et al., 2002, Vargas et al., 2002) mientras que solo en un caso se recurrió a tinción de Gram para efectuar diagnósticos diferenciales con *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Dueger et al., 2003), lo cual plantea dudas sobre la interpretación de las conclusiones expresadas.

Por el contrario, la aplicación de técnicas inmunodiagnósticas permitiría que ovinos portadores de infecciones recientes clasificados como negativos en sala de faena fueran correctamente clasificados como positivos por las pruebas serológicas, tal cual queda demostrado en el presente trabajo.

De tal forma, en áreas de alta prevalencia de infección en ovinos (por ejemplo Perú) puede considerarse que todos los animales están expuestos a la infección como resultado de lo cual además de los animales positivos a sala de faena se encuentra que de los animales negativos a la necropsia el 71.7% resultan seropositivos (Moro et al., 1999, Dueger et al., 2003); en áreas de transmisión limitada (como el presente estudio efectuado en la Provincia de Río Negro) dicha proporción es del 11.4%; mientras que en animales criados en ambientes libres de infección la tasa resulta del 0%-2.3% (Moro et al., 1997, 1999). De acuerdo a lo observado en la presente experiencia, podría estimarse que los animales negativos a la necropsia y positivos a la serología son producto de distintos estadios de infección (oncósferas de infección reciente, quistes incipientes en desarrollo, quistes incipientes en fase de hialinización, etc).

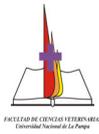
Yong et al. (1984) encontraron en 3 ovinos experimentalmente infectados con baja carga de huevos de *Echinococcus granulosus* (10 huevos) una respuesta de anticuerpos positiva, aunque fallaron en encontrar quistes hidatídicos a la necropsia.

La conversión serológica expresada con posterioridad a la inoculación (Yong et al., 1984) entre los 10 a 14 días posteriores a la inoculación, es también evidencia que animales con infecciones recientes serán clasificados como positivos en las pruebas serológicas y como negativos en sala de faena.

La posibilidad de utilizar en forma sistemática a los estudios histológicos como prueba de referencia presenta sin embargo limitaciones operativas. Así, podría resultar posible confirmar en laboratorio la totalidad de las lesiones macroscópicas con diagnóstico dudoso, pero resultaría sumamente engorroso hacerlo en la totalidad de los diagnósticos negativos para identificar infecciones recientes, lo cual resulta de especial interés para un sistema de vigilancia epidemiológica, en especial en corderos.

Como alternativa, en el presente trabajo se ha utilizado Western Blot como prueba de confirmación para ovinos que resultaban negativos en sala de faena pero resultaban positivos al enzimo inmuno ensayo utilizado como prueba tamiz.

Western Blot, basado en la identificación de fracciones antigénicas especie específicas de 8-12, 16 y 20-24 Kd, ha sido desarrollado para su aplicación en el inmunodiagnóstico de la equinococcosis en el ovino con una especificidad del 98.6%-100% (Moro et al., 1997, Vargas et al., 2002) y sin presentar reacciones cruzadas con otros cestodes. La banda de 8 Kd se ha encontrado presente en todos los animales



seropositivos. La sensibilidad para WB, por su parte, ha sido notificada como del 91.4%-97.6% (Dueger et al., 2003, Vargas et al., 2002).

En el presente trabajo se efectuó un análisis de varianza para comparar las densidades ópticas de sueros de animales con *E. granulosus* diagnosticado macroscópicamente, ovinos clasificados como negativos en sala de faena pero positivos a EIE y WB, sueros de ovinos con otros cestodos y sueros de ovinos libres de infección. Ello permitió establecer con precisión las características comunes existentes entre los ovinos clasificados como positivos por sala de faena o WB y las diferencias estadísticamente significativas con ovinos portadores de otros cestodos y con ovinos sin infección, corroborándose la especificidad del diagnóstico mediante WB y su utilidad como prueba de referencia.

Así, la utilización del diagnóstico macroscópico en sala de faena como prueba patrón para las estimaciones de sensibilidad y especificidad presenta limitaciones tal como queda demostrado en el presente estudio.

Los mejores resultados para validar pruebas serológicas destinadas al tamizaje en poblaciones ovinas deberían incluir la confirmación diagnóstica mediante histología o mediante pruebas serológicas de alta especificidad tal como WB.

AGRADECIMIENTOS

A los Dr Eduardo Guarnera, Aníbal Franco e Irma Sommerfelt por su asesoramiento y correcciones.

REFERENCIAS

Bakos, E., Zurbriggen, M, Soni, C., Draghi, M. 1985. Diagnostico serológico de la hidatidosis ovina mediante la hemaglutinación indirecta. *Veterinaria Argentina*, 17: 624:627.

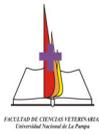
Bradford, M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annles Biochemistry*, 72: 248-257.

Cabrera, P., Irabedra, P., Trindado, J., Agulla, J., Heinzen, T., Cardozo, M., Alvarez, M., Elola, S., Rista, L., Bondad, M., Haran, G., Viñals, G., Mangeney, G., Sambran, Y., Valledor, S., Baralbar, M., Moraña, A., Orlando, D. 1996. Determinación de la prevalencia de la hidatidosis ovina en playas de faena, Uruguay, 1994. *Hidatidosis (Uruguay)*, 2: 18-29

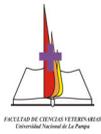
Cabrera, P., Irabedra, P., Orlando, L., Rista, R., Haran, G., Viñals, G., Blanco, M., Alvarez, M., Elosa, S., Morosoli, D., Moraña, A., Bondad, M., Sambran, Y., Heinzen, T., Chans, L., Piñeiro, L., Perez, D., Pereyra, I. 2003. National prevalence larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants. *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. *Acta Trópica*, 85: 281-185.

Coltorti, E. 1986. Standarization and evaluation of an Enzymeimmunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 35: 1000-1005.

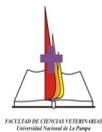
Coltorti, E. Fernandez, E., Marguet, E., Scozzina, J., Guarnera, E. 1990. Detección de portadores asintomáticos de quistes hidatídicos. Aumento de la especificidad del ensayo inmunoenzimático. *Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo*, 32: 275:284.



- Conder, G., Andersen, F., Schantz, P. 1980.** Immunodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: an evaluation of double diffusion, immunoelectrophoresis, indirect hemagglutination, and intradermal tests. *Journal Parasitology*, 66: 577-584.
- Craig, P. 1997.** Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and a comparison of techniques for diagnoses of canine echinococcosis. In *Compendium on echinococcosis in Africa and in a Middle Eastern Countries* (Andersen, F., Ouhelli, H., Kachani, M.) Brigham Young University Print Services, Utah, 86-118.
- Craig, P., Rickard, M. 1981.** Studies on the specific immunodiagnosis of larval cestode infections of cattle and sheep using antigens purified by affinity chromatography in an enzyme linked immunosorbent assay. *International Journal Parasitology*, 83: 303-317.
- Dueguer, E., Gilman, R. 2001.** Prevalence, intensity and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central Peruvian Andes. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 379-383.
- Dueger, E., Verastegui, M., Gilman, R. 2003.** Evaluation of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for ovine hydatidosis relative to age and cyst characteristics in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 114: 285-293.
- Eckert, J., Deplazes, P., Craig, P., Gemmel, M., Gottstein, B., Heath, D., Jenkins, J., Kamiya, M., Lightowers, M. 2001.** Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: *Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern.* (Eckert, J., Gemmel, M., Meslin, F., Pawlowski, Z.) 195-203 WHO/OIE. France.
- Grainer, M. 1995.** Two graph operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft Excel template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *Journal Immunology Method*, 185: 145-146.
- Ibrahim, M., Craig, P., Mcvie, A. 1996.** *Echinococcus granulosus* antigen B and seroreactivity in natural ovine hydatidosis. *Research in Veterinary Science*, 61: 102-106.
- Jubb, K., Kennedy, P., Palmer, N. 1993.** *Pathology of Domestic Animals*, fourth edition. Volumen II, editorial Academic Press Inc.
- Judson, D., Dixon, J., Clarkson, M., Pritchard, J. 1985.** Ovine hydatidosis: some immunological characteristics of the seronegative host. *Parasitology*, 91: 349-357.
- Kitelberger, R., Reichel, M., Jenner, J., Heath, D., Lightowers, M., Moro, P., Ibrahim, M., Craig, P., Keefe, J. 2002.** Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the detection of serum antibodies in sheep infected with *Echinococcus granulosus*. *Veterinary Parasitology*, 110: 57-76.
- Laemli, U. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Larrieu, E., Costa, M., Cantoni, G., Labanchi, J., Bigatti, R., Perez, A., Araya, D., Mancini, S., Herrero, E., Talmon, G., Romeo, S., Thakur, A. 2000.** Control program of hydatid disease in the Province of Río Negro, Argentina, 1980-1997. *Boletín Chileno de Parasitología*, 55: 49-53.
- Larrieu, E., Costa, M., Cantoni, G., Alvarez, R., Cavagion, L., Labanchi, J., Bigatti, R., Araya, D., Herrero, E., Mancini, S., Cabrera, P. 2001.** Ovine *Echinococcus granulosus* transmission dynamics in the province of Río Negro, Argentina, 1980-1999. *Veterinary Parasitology*, 98: 263-272.
- Lightowers, M., Gottstein, B. 1995.** Echinococcosis/Hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. *The biology of Echinococcus granulosus and hydatid disease* (Thompson R, Lymbery J.) 355-396 George Allen and Unwin. London.



- Lightowers, M., Rickard, M., Honey, R., Obendorf, D., Mitchell, G. 1984.** Serological diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in sheep using cyst fluid antigens processed by antibody affinity chromatography. *Australian Veterinary Journal*, 61: 101-108.
- Lloyd, S. Martin, S., Walters, T., Soulsby, E. 1991.** Use of sentinel lambs for early monitoring of the South Powys hydatidosis control scheme: prevalence of *Echinococcus granulosus* and some helminths. *Veterinary Record*, 129: 73-76.
- Ming, R. (1986).** Application of enzyme linked immunabsorbent assay to the diagnosis of echinococcus of sheep and cattle. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 17: 55-62.
- Moro, P., Verastegui, M., Gilman, R., Falcon, N., Bernal, T., Gavidia, C., Malqui, V, Moro, M., Dueger, E. 1997.** Enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of hydatidosis in sheep. *Veterinary Record*, 140: 605-606.
- Moro, P., Bonifacio, N., Gilman, R., Lopera, L., Silva, B., Takumoto, R., Verastegui, M., Cabrera, L. 1999.** Field diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection among intermediate and definitive hosts in an endemic focus of human cystic echinococcosis. *Transaction of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 611-615.
- Oriol, R., Williams, J., Perez Esandi M., Oriol, R. 1971.** Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 20: 569-574.
- Thompson, R. 1995.** Biology and systematics of *Echinococcus*. In *The biology of Echinococcus granulosus and hydatid disease* (Thompson, R., Lymbery, J.) pag 1-50. George Allen and Unwin. London.
- Thompson, R., Mcmanus, D. 2001.** Aetiology: parasites and life cycles. In: *Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern.* (Eckert, J., Gemmel, M., Meslin, F., Pawlowski, Z.) 1-19 WHO/OIE. France.
- Vargas, D., Bonet, R., Campano, S., Chacon, T., y Vidal, M. 2002.** Evaluación epidemiológica de las técnicas de Elisa y Electroinmuno transferencia en el diagnóstico de la hidatidosis ovina en la XI Región de Chile. Tesis Doctoral. Universidad Mayor, Chile.
- Yong, W., Heath, D., Parmeter, N. 1978.** *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* evaluation of cyst fluids as antigen for serodiagnosis of larval cestode in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 26: 231-234.
- Yong, W., Heath, D. 1979.** Arc 5 antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis*. *Parasite Immunology*, 1: 27-38.
- Yong, W., Heath D., Van Kapen, F. 1984.** Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in sheep. *Research in Veterinary Sciences*, 36: 24-31.



Facultad de Ciencias Veterinarias
General Pico - La Pampa, República Argentina

Tabla 1. Relación entre resultados positivos y negativos a *Echinococcus granulosus* de EIE con tres preparaciones antigénicas y dos valores de corte y su relación con resultados positivos y negativos a la prueba patrón. Ovinos naturalmente parasitados. Provincia de Río Negro, 2003/2004

EIE/ histología y WB	Antígeno		
	LHT	S2B	B
	0.157/0.200	0.073/0.106	0.068/0.078
+/+	58/55	52/41	57/56
+/-	19/6	11/1	9/5
-/+	7/10	13/17	13/10
-/-	163/176	171/181	168/176
Total	247	247	247

Figura 1. Capacidad de EIE de discriminar entre ovinos naturalmente parasitados con *Echinococcus granulosus*, forma larval de *T. hydatigena*, *Taenia* spp. y ovinos no parasitados. Provincia de Río Negro, 2003/2004

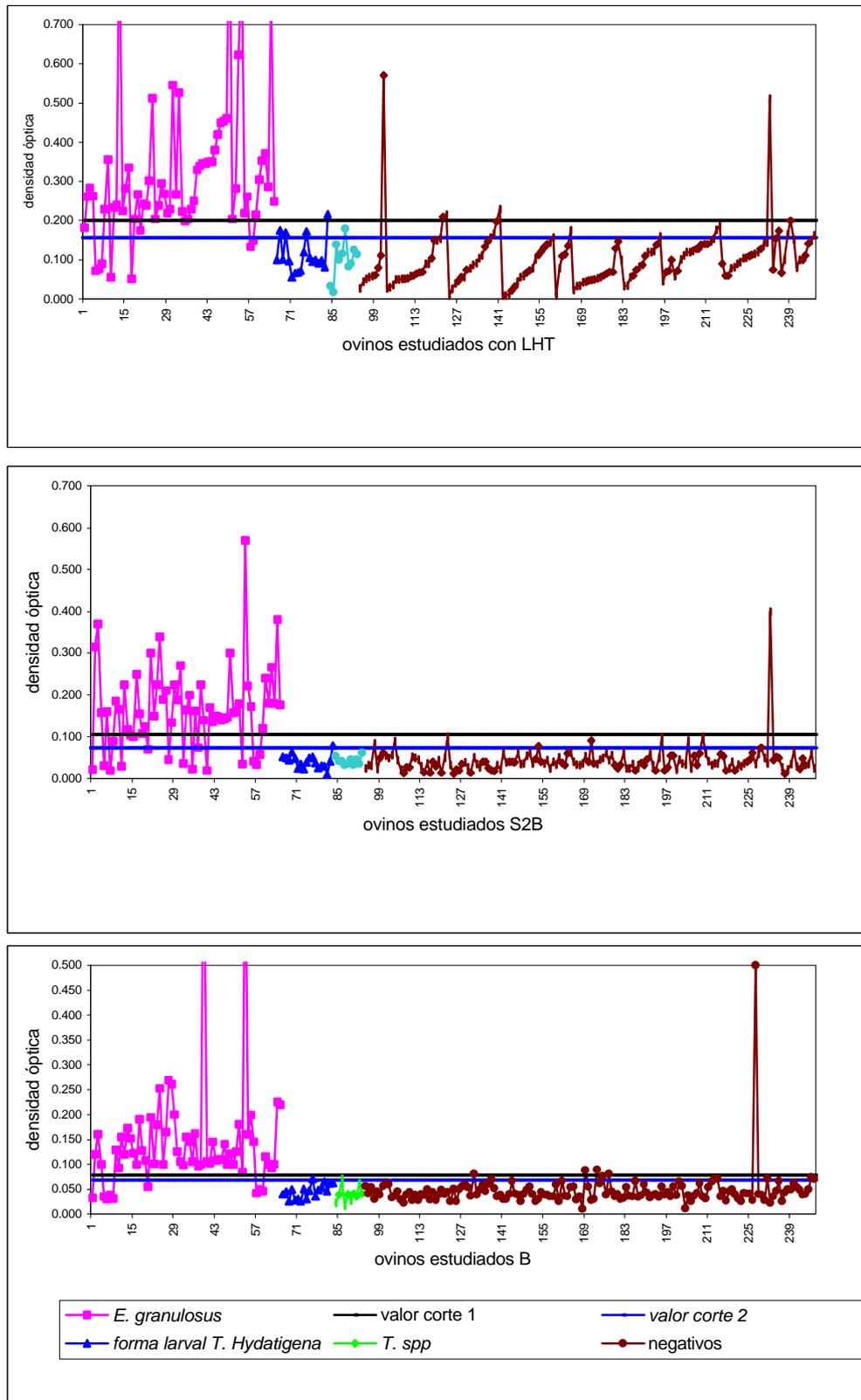


Figura 2. Frecuencia de la distribución de absorbancias con diferentes antígenos en ovinos con E. granulosus y sin E. granulosus. Provincia de Río Negro, 2003/2004

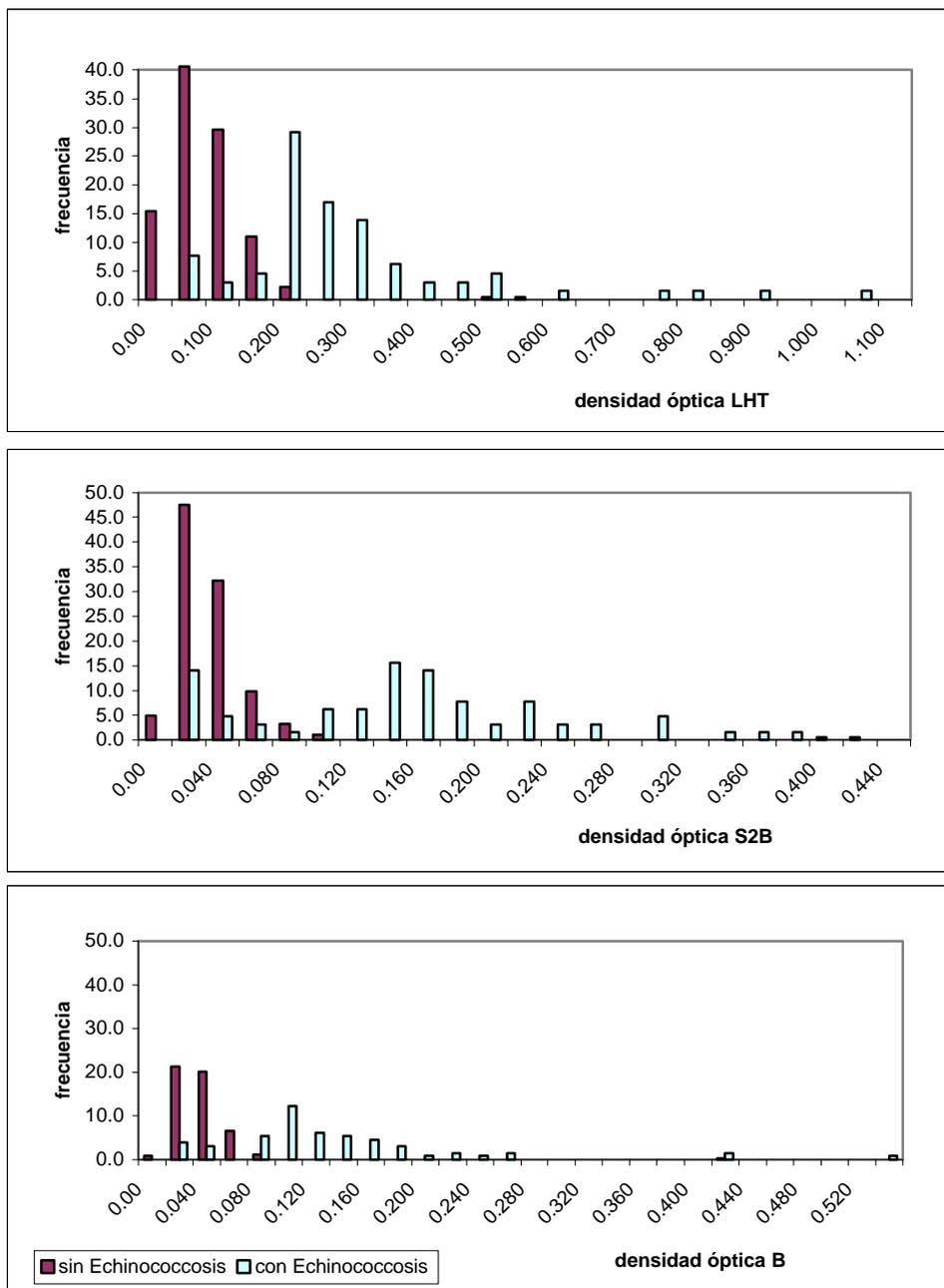


Tabla 2. Resultados del análisis de ANOVA y de la prueba de DMS protegida de Fischer en relación a las densidades ópticas a la prueba de EIE. LHT en cinco grupos de ovinos, Provincia de Río Negro, 2003/2004.

Grupo	D.O. Media (E.est.)	D.O. Varianza	DMS	Diferencias (valor de p)
1 (Faena - / <i>E. g.</i> WB +)	0.36 (0.028)	0.05	C	1 - 2: p: 0.046
2 (Faena/Hist. <i>E.g.</i> +)	0.28 (0.028)	0.012	B	2 - 3: p: 0.00
3 (Faena - / EIE.LHT -)	0.09 (0.028)	0.003	A	3 - 4 - 5: p > 0.05
4 (<i>T.hyd.</i> +)	0.11 (0.04)	0.002	A	
5 (<i>T. spp</i> +)	0.10 (0.03)	0.002	A	

F: 17.2 p: 0.00

Figura 3. Medias y error estándar obtenidos mediante análisis de ANOVA en cinco grupos de ovinos, Provincia de Río Negro, 2003/2004

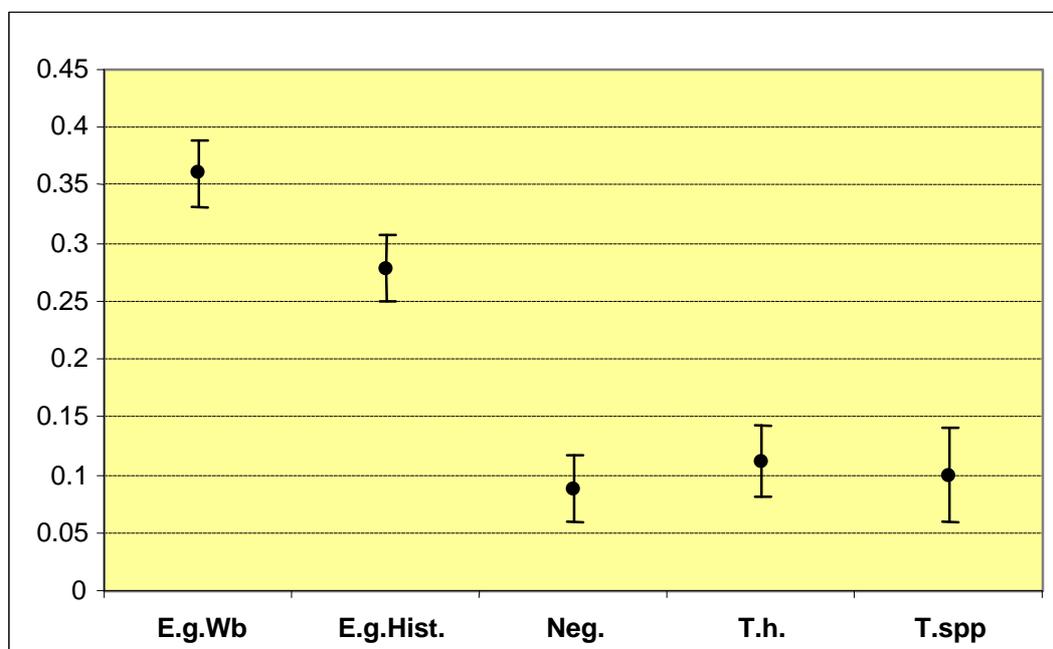


Tabla 3. Porcentaje de ovinos EIE positivos que resultaron negativos a la necropsia y su relación con la prevalencia de echinococcosis en la majada.

Area de estudio	Prevalencia de			Porcentaje de ovinos negativos		
	echinococcosis ovina en la			a necropsia y positivos a EIE		
	majada			n°	+	%
	n°	+	%			
Perú ⁽¹⁾	212	152	71.7	60	47	78.3
Endémico, sin programa de control						
Río Negro	247	45	18.2 ⁽²⁾	202	23	11.4
Endémico, con programa de control						
Ovinos criados libres	43	0	0.0	42	1	2.3
de infección ^(3,4)	36	0	0.0	36	0	0.0

Chi cuadrado para tendencia lineal p: 0.00

1: Dueger et al., 2001, 2003

2: Larrieu et al., 2001

3: Moro et al., 1997

4: Moro et al., 1999

Tabla 4. Estimación de la sensibilidad del diagnóstico inmunológico mediante EIE, utilizando histología y WB como prueba patrón, a diferentes grupos de edad, con diferentes preparaciones antigénicas y a distintos valores de corte.

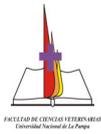
Grupo de edad	Antígeno					
	LHT		S2B		B	
	0.200	0.157	0.106	0.073	0.078	0.068
0-6 meses	78.6 (76.7-80.5)	78.6 (76.7-80.5)	71.4 (69.5-73.3)	75.0 (73.1-76.9)	64.3 (60.6-68.2)	64.3 (60.6-68.1)
7-23 meses	100 (90.0-100)	100 (90.0-100)	80.0 (74.8-85.1)	90.0 (84.9-95.1)	80.0 (74.8-85.1)	90.0 (84.9-95.1)
24-más	90.6 (89.0-92.2)	96.8 (95.3-98.3)	77.3 (76.1-78.5)	96.8 (95.3-98.5)	92.7 (91.4-93.9)	90.9 (89.7-92.1)
TOTAL	84.6 (83.8-85.4)	89.2 (88.4-90.1)	72.7 (71.9-73.6)	80.0 (79.2-80.8)	84.5 (84.0-85.6)	86.4 (85.6-87.1)

nota: valor (IC95%)

Tabla 5. Estimación de la especificidad del diagnóstico inmunológico mediante EIE, utilizando histología y WB como prueba patrón, a diferentes grupos de edad, con diferentes preparaciones antigénicas y a distintos valores de corte.

Grupo de edad	Antígeno					
	LHT		S2B		B	
	0.200	0.157	0.106	0.073	0.078	0.068
0 - 6 meses	94.7 (93.8-95.2)	89.5 (88.5-90.4)	100 (99.1-100)	92.9 (92.1-93.9)	98.6 (97.8-99.3)	94.4 (93.6-95.1)
7 - 23 meses	100 (100-100)	92.7 (91.8-93.7)	100 (99-100)	98.0 (96.9-99.0)	94.0 (92.9-95.1)	88.0 (86.9-89.1)
24 - más	97.1 (96.4-97.8)	87.1 (86.4-87.9)	96.8 (96.1-97.6)	87.1 (86.4-87.9)	98.3 (97.5-99.2)	92.1 (91.2-92.9)
TOTAL	97.2 (96.9-97.5)	89.5 (89.2-89.8)	99.4 (99.2-99.7)	93.9 (93.7-94.2)	97.2 (96.9-97.5)	92.8 (92.5-93.1)

nota: valor (IC95%)



Facultad de Ciencias Veterinarias
General Pico - La Pampa, República Argentina

Tabla 6. Resultados de las pruebas diagnósticas simples y del análisis ROC con distintas preparaciones antigénicas utilizando histología/WB como prueba patrón.

Antígeno	LHT		S2B		B	
Valor de corte	0.157	0.200	0.073	0.106	0.068	0.078
Sensibilidad	89.2	84.6	80.0	72.7	86.4	84.5
Especificidad	89.5	97.2	93.9	99.4	92.8	97.2
V. predictivo +	67.9	89.8	74.2	96.4	72.5	86.8
V. predictivo -	97.7	96.2	95.6	94.3	96.9	96.6
Area bajo la curva ROC	0.930		0.860		0.890	