

Sección: Comunicación corta

Guía para el uso del inmunodiagnóstico en ovinos aplicado a la vigilancia epidemiológica de la equinococosis quística

Artículo de Poggio TV, Mujica G, Prada J, Larrieu E

CIENCIA VETERINARIA, Vol. 24 (2022) ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea)

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet20222407>

Guía para el uso del inmunodiagnóstico en ovinos aplicado a la vigilancia epidemiológica de la equinococosis quística

*Guide for the use of immunodiagnostic in sheep
applied to the epidemiological surveillance of
cystic echinococcosis*

*Guia para uso do imunodiagnóstico em ovinos
aplicado à vigilância epidemiológica da
equinococose cística*

Poggio TV¹, Mujica G², Prada J³, Larrieu E⁴

- 1 Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein (CONICET), Saladillo 2468 (C1440FFX) –Buenos Aires, Argentina.
- 2 Salud Ambiental Bariloche Ministerio de Salud, Provincia de Río Negro, Laprida 240 Viedma, Argentina.
- 3 Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK.
- 4 Instituto de Zoonosis. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, calle 5 esq. 116 General Pico, Argentina.

Correo electrónico: vpoggio69@gmail.com

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet20222407>

Fecha de recepción del artículo: 30/03/2022

Fecha de aceptación para su publicación: 08/06/2022

RESUMEN

La equinococosis quística (EQ) es una zoonosis parasitaria causada por *Echinococcus granulosus sensu lato*. Técnicas inmunodiagnósticas como Western blot (WB) o el enzimoimmunoensayo (ELISA), con distintos antígenos, pueden ser aplicadas al diagnóstico de la EQ ovina con fin tales de vigilancia epidemiológica en programas de control.



Esta obra se publica bajo licencia Creative Commons 4.0 Internacional. (Atribución-No Comercial-Compartir Igual) a menos que se indique lo contrario, <http://www.creativecommons.org.ar/licencias.html>

Sin embargo, hay limitación para su uso por la existencia de reacción cruzada antigénica entre diferentes especies de taeniidas presentes en el ovino. A pesar de ello se ha postulado la utilidad de establecer sistemas de vigilancia basados en la identificación de infección presente en un establecimiento ganadero, a lo que se denomina Unidad Epidemiológica (UE). Una nueva técnica diagnóstica de ELISA ha sido desarrollada y validada utilizando el antígeno EgAgB8/2 recombinante, para detección de anticuerpos contra *E. granulosus*, estimándose una DO 0.496 como el valor de corte que optimiza la sensibilidad y especificidad. Para la determinación de la infección en UE se construyó un modelo bayesiano ejecutado con un algoritmo de cadena de Markov Monte Carlo que permitió definir los tamaños de muestra para diferentes prevalencias esperadas para asegurar que al menos dos de las muestras sean verdaderamente positivas. De tal forma, el sistema puede ser usado para identificar la prevalencia de la infección en el área bajo control medida como porcentaje de UE con ovinos infectados (infección presente) o identificar individualmente las UE con transmisión presente, dada por la existencia de corderos infectados, sobre las que se deben intensificar las medidas de control.

Palabras clave: Equinococosis, Inmunodiagnóstico, Ovinos, Vigilancia, Control

ABSTRACT

Cystic echinococcosis (CE) is a parasitic zoonosis caused by *Echinococcus granulosus sensu lato*. Immunodiagnostic techniques such as Western blot (WB) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with different antigens, can be applied to the diagnosis of CE sheep for epidemiological surveillance purposes in control programs. However, its use is limited by the existence of antigenic cross-reactivity between different species of taeniidae present in sheep. Despite this, the usefulness of establishing surveillance systems based on the identification of infection present in a livestock establishment, known as the Epidemiological Unit (UE), has been postulated. A new ELISA diagnostic technique has been developed and validated using the recombinant EgAgB8/2 antigen for the detection of antibodies against *E. granulosus*, estimating an OD 0.496 as the cut-off value that optimizes diagnostic sensitivity and specificity. To determine the infection in the EU, a Bayesian model was built, executed with a Monte Carlo Markov chain algorithm, which allowed defining the sample sizes for different expected prevalences to ensure that at least two of the samples are truly positive. In this way, the system can be used to identify

the prevalence of infection in the area under control measured as a percentage of EU with the presence of infected sheep (infection present) or individually identify the EU with present transmission, given by presence of infected lambs, on which control measures should be intensified.

Keywords: Echinococcosis, Immunodiagnostics, Sheep, Surveillance, Control

RESUMO

A equinococose cística (CK) é uma zoonose parasitária causada por *Echinococcus granulosus* sensu lato. Técnicas de imunodiagnóstico como western blot (WB) ou ensaio imunoenzimático (ELISA), com diferentes antígenos, podem ser aplicadas no diagnóstico da DQ ovina para fins de vigilância epidemiológica em programas de controle. No entanto, seu uso é limitado pela existência de reação cruzada antigênica entre diferentes espécies de taeniidae presentes em ovinos. Apesar disso, postula-se a utilidade de estabelecer sistemas de vigilância baseados na identificação de infecção presente em um estabelecimento pecuário, conhecido como Unidade Epidemiológica (UE). Uma nova técnica de diagnóstico ELISA foi desenvolvida e validada utilizando o antígeno recombinante EgAgB8/2 para a detecção de anticorpos contra *E. granulosus*, estimando uma DO 0,496 como valor de corte que otimiza a sensibilidade e especificidade. Para determinar a infecção na UE, foi construído um modelo Bayesiano, executado com um algoritmo de cadeia de Monte Carlo Markov, que permitiu definir os tamanhos das amostras para diferentes prevalências esperadas para garantir que pelo menos duas das amostras sejam verdadeiramente positivas. Desta forma, o sistema pode ser utilizado para identificar a prevalência de infecção na área sob controle medida em porcentagem da UE com ovinos infectados (infecção presente) ou identificar individualmente a UE com transmissão presente, dada a existência de cordeiros infectados, em quais medidas de controle devem ser intensificadas.

Palavras-chave: Equinococose, Imunodiagnóstico, Ovinos, Vigilância, Controle

Introducción

La equinocosis quística (EQ) es una zoonosis parasitaria causada por *Echinococcus granulosus sensu lato*, parásito Cestoda, familia Taeniidae. El ciclo de vida involucra a dos huéspedes mamíferos. Los definitivos son carnívoros (especialmente perros) y los intermedios son ungulados (siendo ovejas y cabras los de mayor importancia epidemiológica)⁽¹⁾.

El objetivo de la presente comunicación es describir una estrategia para aplicar la serología ovina utilizando un novel antígeno recombinante para la realización de pruebas de ELISA para la vigilancia epidemiológica de la EQ.

En tal sentido, la vigilancia de EQ en el marco de programas de control está dirigida hacia los distintos huéspedes: humanos, perros y ovinos y caprinos⁽²⁾. El diagnóstico en ovinos y caprinos se puede realizar macroscópicamente en salas de faena⁽³⁻⁵⁾. Sin embargo, en la mayoría de las zonas endémicas estas no existen y el abastecimiento urbano suele ser efectuado en carnicerías locales sin infraestructura ni inspección sanitaria. En áreas rurales, por su parte, lo habitual es el sacrificio domiciliario para consumo personal o venta al menudeo. Por ello, si bien la inspección *post mortem* es la técnica de elección, es dificultoso o virtualmente imposible basar el sistema de vigilancia en esta fuente de datos.

Además, el diagnóstico macroscópico en corderos tiene falsos negativos (pueden no ser detectadas infecciones recientes o no ser observados quistes hidatídicos pequeños recientemente formados). En animales de varios años de edad por su parte, puede haber falsos positivos (presencia de quistes supurados o calcificados debido a otras infecciones o afecciones)⁽⁴⁾.

Técnicas inmunodiagnósticas como western blot (WB) o el enzoinmunoensayo (ELISA), con distintos antígenos, pueden ser aplicadas al diagnóstico de la EQ ovina^(3,5,6-7). Sin embargo, hay limitación para su uso en el ovino en tanto las infecciones por parásitos cestodos distintos del *E. granulosus* (*T. hydatigena*, *Monezia*, *Taenia ovis*, *Taenia multiceps*) son comunes en ovejas y cabras, existiendo evidencia de reactividad cruzada antigénica entre las diferentes especies de taeniidae^(2,5-6).

UTILIDAD DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN OVINOS

Se ha postulado la utilidad de establecer sistemas de vigilancia basados en la identificación de infección presente en un establecimiento ganadero, a lo que se denomina Unidad Epidemiológica (UE), en lugar

de la estimación del porcentaje de perros parasitados tradicionalmente utilizado. ⁽⁸⁾ El mismo criterio podría ser aplicado para identificar:

- a. UE con transmisión presente de EQ basado en la presencia de corderos infectados con *E. granulosus*.
- b. UE con EQ basado en la presencia de ovinos de cualquier categoría infectados.
- c. Ovinos con EQ en rebaños que ingresaran a áreas libres de infección.

Uso en sistemas de vigilancia epidemiológica posibilitaría:

- a. Identificar las UE donde la transmisión se mantiene a pesar de las medidas de control, para intensificar acciones sobre ellas.
- b. Establecer la tendencia de la EQ en el área bajo programa estimando anualmente (o periódicamente) el porcentaje de UE con corderos infectados
- c. Establecer el diagnóstico inicial de la prevalencia de EQ en la majada ovina.

Finalmente, los programas de control contra EQ no tienen ningún interés en el diagnóstico individual de infección por *E. granulosus* en tanto se carece de tratamientos específicos validados y asimismo, porque el interés epidemiológico es la determinación de la infección en el rebaño.

Para utilizar el inmunodiagnóstico en el ovino con fines de vigilancia se requiere

- a. Contar con técnicas serológicas validadas.
- b. Ajustar los tamaños de las muestras de animales a ser estudiados para eliminar o disminuir los sesgos dados por las reacciones cruzadas con otros cestodos.

INMUNODIAGNÓSTICO EN OVINOS

La supervivencia de *E. granulosus* depende de mecanismos de evasión eficientes que operan hacia el desarrollo de un quiste hidatídico. ^(1,2,6) De tal manera, el desarrollo de pruebas inmunodiagnósticas para tamizaje destinadas a la detección de *E. granulosus* depende de la interacción entre el hospedador y el parásito durante el curso de la infección.

La respuesta inmune del hospedador rumiante frente a la infección está dirigida contra la oncosfera, contra componentes del quiste inmaduro y/o contra metacestodes fértiles y protoscolices ^(1,2,6) a respuesta IgG anti-fluido del quiste hidatídico de *E. granulosus* contra antígenos de la oncosfera aparece luego de 4 a 11 días de ocurrida la infección en ovinos experimentalmente desafiados con huevos u oncosferas y persisten por lo menos 4 años, aunque no siempre conduce a un aumento

significativo de los títulos de anticuerpos y tampoco se mantiene durante todo el curso de la infección. ^(9,10)

El líquido hidatídico es una mezcla compleja de distintos antígenos siendo los principales las lipoproteínas antigénicas: Ag 5 y Ag B. El Ag B es el más abundante y es una lipoproteína termoestable de 120-160-kDa que contiene subunidades: 8 o 12, 16, y 20 o 24 kDa ^(1,2,6)

Se encontró que una familia multigénica que codifica para el antígeno de 8-kDa (EgAgB8/1 a EgAgB8/5) está compuesta de muchos miembros con alta diversidad, por lo que su uso proporcionará evidencia molecular de reacción cruzada o reacción específica entre las infecciones con metacestodos ^(1,2,6,11)

Una nueva técnica diagnóstica de ELISA ha sido desarrollada y validada utilizando el antígeno EgAgB8/2 recombinante, para detección de anticuerpos contra *E. granulosus*⁽¹¹⁾ Su especificidad y sensibilidad analítica fue evaluada con un panel de sueros control de ovinos experimentalmente infectados (n=40), libres de la enfermedad (n=79) y de animales naturalmente infectados con otras parasitosis (n=20), observándose una satisfactoria capacidad de discriminación entre sueros positivos de distinta reactividad, sueros negativos y pocillos sin antígeno. El desempeño diagnóstico del ELISA a nivel individual y a nivel rebaño se determinó mediante curvas ROC, estimándose una DO 0.496 como el valor de corte que optimiza la sensibilidad y especificidad ^(11,12).

ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para la determinación de la infección en UE se construyó un modelo bayesiano ejecutado con un algoritmo de cadena de Markov Monte Carlo ⁽¹¹⁾ que permitió definir los tamaños de muestra para diferentes prevalencias esperadas para asegurar que al menos dos de las muestras sean verdaderamente positivas.

En la tabla 1 se presentan los tamaños de muestra que se deben obtener para distintas prevalencias esperadas para valores predictivos positivos de 80% y 90% (recomendable), bajo la premisa que el tamaño de la muestra no depende del número de animales de la majada sino fundamentalmente de la prevalencia esperada, que surge de nuestro conocimiento de la epidemiología local y de antecedentes bibliográficos o reportes de estudios comparables. ⁽¹³⁾

Tabla 1. Referencia para estimación de los tamaños de muestra de acuerdo a la prevalencia esperada para identificar transmisión presente con un valor de corte de 0.496, en función del valor predictivo positivo (VPP) deseado. Para prevalencias esperadas superiores a 40%, se recomienda usar el tamaño de muestra estimado para el 40%.

VPP	PREVALENCIA ESPERADA								
	1%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
80%	21	18	18	17	16	16	15	14	14
90%	29	28	25	22	21	20	20	18	18

Obtención de muestras séricas e interpretación de resultados

Definido el tamaño de la muestra se seleccionarán aleatoriamente los animales a ser estudiados.

La UE podrá estar constituida por:

- Un solo establecimiento ganadero con un número de cabezas de ganado suficiente para cubrir el muestreo.
- En caso de pequeños productores con escaso número de animales se podrá repartir la muestra entre varios productores (por ejemplo, en el caso de reservas de población originaria que comparten territorio).

En ovinos se obtendrá 10 cc. de sangre de la vena yugular, sujetos, en posición de pie y con la cabeza fijada lateralmente, utilizando 25/8 y jeringas plásticas descartables.

Los tubos serán rotulados con un número que identifique al animal (en caso de animales sin identificación, números sucesivos a partir del 1) y uno que identifique al productor. Los datos se volcarán en una planilla de registro que deberá contener los números citados, el nombre del productor, el área geográfica (georreferenciada) y la fecha de obtención. Se deberán registrar asimismo el número total de ovinos existentes y el número total de corderos.

El suero se extraerá mediante centrifugación, se conservará refrigerado a 5º/8 ºC hasta su remisión a laboratorio (48 hs. máximo) en donde se mantendrá en freezer a - 20 ºC hasta su procesado.

Interpretación de resultados: dos ovinos con valores serológicos superiores al valor de corte *DO 0.496* será indicativo de infección presente (si se trata de masa ovina) o reciente (si se trata de corderos).

Conclusiones

Los sistemas modernos de vigilancia de la EQ en animales tienen como objetivo:

-
- a. Identificar la prevalencia de la infección en el área bajo control medida como porcentaje de UE con presencia de ovinos infectados (infección presente) con posibilidades de transmitir la infección a los perros y subsecuentemente a las personas, constituyendo una línea base sobre la cual evaluar la tendencia de la enfermedad en función de las medidas de control aplicadas.
 - b. Identificar individualmente las UE con transmisión presente, dada por la presencia de corderos infectados, sobre las que se deben intensificar las medidas de control, generalmente basadas en la desparasitación de perros con praziquantel o mediante la vacunación de ovinos con EG95.

De tal forma el ELISA en ovinos puede ser utilizado, solo o asociado al tradicional CoproELISA en perros ^(2,8) u otras técnicas diagnósticas en el huésped definitivo, como una nueva herramienta de vigilancia de la EQ en forma estandarizada al servicio de los programas de control.

Ambos ofrecen ventajas logísticas porque las muestras se pueden obtener con el mismo personal, los resultados de ambos sistemas pueden complementarse y, finalmente, ambas técnicas son sencillas, económicas y accesibles a países con pocos recursos y tecnología limitada en sus laboratorios pudiendo ser utilizadas para la identificación de la existencia de transmisión de *E. granulosus* y ajustar en consecuencia las medidas de control.

Bibliografía

1. Thompson RCA, McManus D. Aetiology: parasites and life cycles. In: Eckert J, Gemmel M, Meslin F, Pawlowski Z. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern. WHO/OIE. France. 2001; p. 1-10.
2. Craig PS, Hegglin D, Lightowlers MW, Torgerson PR, Wang Q. Echinococcosis: Control and Prevention. In: Thompson, R.C.A., Deplazes, P., Lymbery, A. J., (Eds.), Echinococcus and Echinococcosis, 2017; Part B, pp. 55–158.
3. Moro P, Verastegui M, Gilman RH, Falcon N, Bernal T, et al. Enzyme-linked immunotransfer blot assay for diagnosis of hydatidosis (*Echinococcus granulosus*) in sheep. Vet. Rec. 1997; 140, 605–606.
4. Cabrera PA, Irabedra P, Orlando D, Rista L, Harán G, et al. National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. Acta Trop. 2003; 85(2):281-5.
5. Craig P, Mastin A, van Kesteren F, Boufana B. *Echinococcus granulosus*: epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. Vet. Parasitol. 2015; 213:132e148.
6. McManus DP. Immunodiagnosis of sheep infections with *Echinococcus granulosus*: in 35 years where have we come? Parasite Immunol. 2014; 36(3):125-30.
7. Gatti A, Alvarez AR, Araya D, Mancini S, Herrero E, et al. Ovine echinococcosis. I. Immunological diagnosis by enzymeimmunoassay. Vet. Parasitol. 2007; 143:112–121.
8. Guarnera EA, Santillan G, Botinelli R, Franco A. Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. Vet Parasitol. 2000; 88(1-2):131-4.
9. Lamberti R, Cavagion L, Gatti A, Calvo C, Gino L, Puches VV, et al. Humoral response and evolution of *Echinococcus* infection in experimentally infected sheep. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2014; 23(2),237-40.
10. Larrieu E, Alvarez AR, Gatti A, Mancini S, Bigatti R, et al. Fisiopatología y respuesta inmune de ovinos experimentalmente infectados con *Echinococcus granulosus*. Medicina (B. Aires). 2009; 69(3),341-346.
11. Sykes AI, Larrieu E, Poggio TV, Céspedes G, Mujica G, et al. Modelling diagnostics for *Echinococcus granulosus* surveillance in sheep using Latent Class Analysis: Argentina as a case study. One Health. 2021; 4,14:100359
12. Poggio TV, Gómez JM, Boado LA, Vojnov AA, Larrieu E, Mujica GB, et al. Immunodiagnosis of cystic echinococcosis in livestock: Development and validation dataset of an ELISA test using a recombinant B8/2 subunit of *Echinococcus granulosus* sensu lato. Data in Brief 42 (2022) 108255.
13. Larrieu E. Manual de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria. Editorial UNRN, Rio Negro, Argentina. 2021; 181pp.