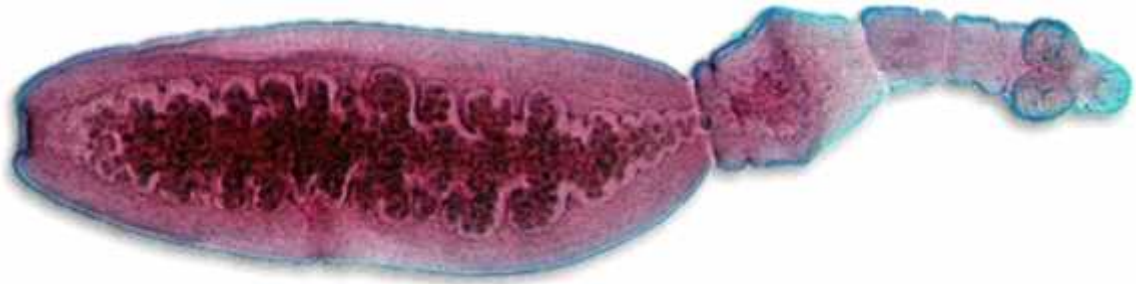


Tesis de Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias, UdelaR

*Desarrollo de un kit de diagnóstico de
equinococosis canina, como soporte para las
campañas regionales de vigilancia y control de la
hidatidosis*



Lic. Noelia Morel

Tutor: Dr. Gualberto González-Sapienza

Cátedra de Inmunología de Facultad de Química, UdelaR

Comisión Nacional de Zoonosis

Tribunal: Dr. Carlos Carmona, Dr. Alejandro Chabalgoity, Dr. José Venzal

21 de noviembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

- A Gualberto, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por la formación, el apoyo y el estímulo que me brindó siempre.
- A Cecilia Casaravilla, por sus valiosos consejos en los comienzos de este trabajo y por cederme desinteresadamente todo el material que tenía disponible.
- A Susana y Mauricio, mis compañeros del laboratorio de la CNZ, por todo el trabajo realizado y compartido durante todos estos años.
- Al Dr. Carlos Carmona, por la orientación brindada y por cederme muestras de estudios anteriores.
- A todo el personal de la Comisión Nacional de Zoonosis, al Dr. Ciro Ferreira por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.
- Al Dr. Oscar Jensen por su invalorable aporte de muestras de referencia.
- A todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, en especial a los de la “Casita del Fondo”, por toda su ayuda y los buenos momentos compartidos fuera del laboratorio. Gracias Rossotti, Maca, Sofi, Lu, Gaby, Andrés y Carlito.
- A Gabriel Lassabe, por la ayuda brindada con la caracterización y purificación de los anticuerpos.
- A Gustavo Mourglia y Sylvia Dematteis por cederme antígenos de protoescólices y el anticuerpo monoclonal E492.
- A Paula Arbildi, por enseñarme a utilizar las herramientas de Word que tanto me facilitaron la escritura de esta tesis.
- A los profesionales de Perú que colaboraron en este proyecto, principalmente a la Dra. Silvia Herrera Bernuy, gracias a su colaboración fue posible realizar una gran parte del trabajo en su país.
- A los integrantes del Tribunal, Dr. Carlos Carmona, Dr. Alejandro Chabalgoity y Dr. José M. Venzal, por disponer de su tiempo para evaluar este trabajo.
- A la CNZ, ANII, OPS y NIH Fogarty International Center por la financiación.
- A todos mis compañeros del DLSP, en especial a Lety, Ana, Viví, Marilo, Dora y Dinorah, por su apoyo incondicional en todos los aspectos.
- A Karina e Isabel, mis amigas de toda la vida.

- A las amigas que me dio la Facultad de Medicina: Mery, Joha, Syl, Alli y Elisa.
- A Mariana Pacheco, la amiga que me quedó de la licenciatura.
- A toda mi familia, sobre todo a mis padres, por el estímulo que me dieron siempre para superarme y por su apoyo, a pesar de no entender a veces qué es lo que estoy haciendo.
- A mis sobrinos adorados, Lu, Manu, July, Jero y Agus, los quiero con todo mi corazón.
- A Camilo, por ser una personita tan hermosa y colmar mi vida de amor y alegría.
- A Álvaro, por ser mi gran compañero de vida, familia, amigo y todo, por su apoyo incondicional, por los proyectos que hemos concretado juntos, el más especial, nuestro hijo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	1
CONTENIDO	3
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	7
DESCRIPCIÓN DEL PARÁSITO	8
CICLO BIOLÓGICO	12
EPIDEMIOLOGÍA.....	14
VIGILANCIA DE LA HIDATIDOSIS	18
DIAGNÓSTICO EN EL HOSPEDERO INTERMEDIARIO	19
DIAGNÓSTICO EN HUMANOS.....	19
DIAGNÓSTICO EN EL HOSPEDERO DEFINITIVO	21
PROGRAMAS DE CONTROL	30
OBJETIVOS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
METODOLOGÍA.....	34
INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PERROS	34
PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	36
RECOLECCIÓN DE ADULTOS DE <i>Echinococcus granulosus</i> y <i>Taenia hydatigena</i>	36
PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS	37
SDS-PAGE y WESTERN BLOT	38
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	39
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	40
MONTAJE y OPTIMIZACIÓN DEL coproELISA	40
MUESTRAS DE CAMPO.....	42

FORMATO RÁPIDO DEL ENSAYO	43
RESULTADOS.....	45
INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PERROS	45
CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS	46
SELECCIÓN INICIAL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	48
CoproELISA MONTADO CON EL AcMo CPR39	48
NUEVA SELECCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	50
CoproELISA MONTADO CON EL AcMo Eg9	53
CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DEL ENSAYO	57
REACTIVIDAD DEL coproELISA Eg9 FRENTE A DISTINTOS ANTÍGENOS PARASITARIOS	57
VALIDACIÓN DEL ENSAYO CON MUESTRAS DE CAMPO	59
FORMULACIÓN DEL ENSAYO EN UN FORMATO DE KIT DIAGNÓSTICO.....	67
CoproELISA Eg9 VERSUS KIT COMERCIAL	71
REPRODUCIBILIDAD Y APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE CAMPO	74
APLICACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ENSAYO	75
FORMATO RÁPIDO DEL ENSAYO	77
DISCUSIÓN	81
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXO.....	93

RESUMEN

La hidatidosis es una enfermedad prevenible a través de la implementación de programas de control efectivos. El perro es un componente central para cortar el ciclo de transmisión y conocer la infección canina es un indicador de la efectividad del programa. El método diagnóstico que ha mostrado más efectividad es la detección de coproantígenos del parásito, pero no hay al momento test comerciales o de fabricación local disponibles, significando un serio obstáculo para su correcta instrumentación.

Este trabajo tuvo como objetivo el desarrollo de un test de detección de coproantígenos, con reactivos de producción local que aseguren su suministro en el tiempo, y con altos estándares de sensibilidad y especificidad caracterizados con muestras de perros diagnosticados por necropsia (“gold standard”). Para esto se realizaron infecciones experimentales en perros, de modo de generar muestras en condiciones controladas y producir antígenos. Con estos antígenos se prepararon anticuerpos policlonales y monoclonales, y se realizaron numerosos procesos de selección de los mismos, usando muestras de perros con baja carga y muestras de perros infectados con *Taenia hydatigena*. Finalmente se montó un copro-ELISA “sándwich” basado en el uso de anticuerpos policlonales para la captura y del monoclonal Eg9 para la detección, que permitió el diagnóstico de animales positivos antes del período prepatente, aún aquellos con baja carga parasitaria, y que presentó una baja reactividad cruzada con *Taenia hydatigena*. El análisis con un importante panel de muestras de campo y de infecciones experimentales, permitió establecer la sensibilidad, 92,6%, y especificidad, 86,4%, que están entre los valores más altos reportados para los ensayos validados contra la técnica de referencia. Los componentes del ensayo fueron estabilizados en un formato de kit “pronto para usar”, para facilitar su uso y transferencia. Actualmente se está utilizando en la Comisión Nacional de Zoonosis, y con el apoyo de la OPS ha sido transferido a las autoridades de salud de Perú (que lo ha incorporado como método para su programa de control) y se ha comenzado un proceso similar con Chile. Finalmente, se comenzó a explorar la

adaptación del test en un formato rápido de flujo lateral, a fin de facilitar el diagnóstico *in situ*. Los resultados preliminares son promisorios e indican que en un tiempo de reacción de 15 minutos, la sensibilidad y especificidad serían equivalentes a las del coproELISA Eg9.

INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es una enfermedad quística crónica, causada por un helminto del género *Echinococcus* (familia Taeniidae), denominada también equinococosis.

Se reconocen tres formas clínicas: la equinococosis quística causada por *Echinococcus granulosus*, la equinococosis alveolar causada por *Echinococcus multilocularis* y la equinococosis neotropical causada por *Echinococcus vogeli* (poliquística) y *Echinococcus oligarthus* (uniquística) (D'Alessandro and Rausch, 2008). La equinococosis quística humana es la presentación más frecuente y responsable de más del 95% de los 2 a 3 millones de casos a nivel mundial, con una mortalidad de 2 a 4%. La equinococosis alveolar provoca cerca de 0,3 a 0,5 millones de casos, todos confinados al hemisferio norte, mientras que sólo se han reportado 150 casos de la forma neotropical, todos en Centroamérica y América del Sur (Craig et al., 2007; McManus et al., 2012). Hasta el año 2005 sólo se reconocían estas 4 especies, pero recientemente se ha descrito una quinta especie, denominada *Echinococcus shiquicus*, presente en zorros de la meseta tibetana, aunque no se ha reportado hasta el momento enfermedad en humanos (Xiao et al., 2006). Una sexta especie, *Echinococcus felidis*, se ha aislado en leones de África, cuyo potencial zoonótico es también desconocido (Huttner et al., 2008). Todas las especies son morfológicamente diferenciables, tanto en el estadio larval como adulto. Con respecto a la larva se observan diferencias en el tipo de quiste desarrollado (unilocular, multilocular) y en el tamaño de los ganchos de los protoescólices; mientras que en el adulto se presentan diferencias en longitud, número de segmentos, tamaño de los ganchos, apertura del poro genital, número de testículos, forma del útero, etc.

En nuestro continente la especie predominante y que representa un serio problema de salud es *E. granulosus*, que en su estado larval es el agente causante de la equinococosis quística o hidatidosis unilocular. Esta enfermedad es una de las zoonosis asociada a cánidos de mayor importancia y figura entre las zoonosis parasitarias patógenas de mayor distribución geográfica a nivel mundial, afectando grandes zonas de Sudamérica, Australia, África Oriental, Asia Central, Europa Central y Mediterránea

incluyendo África del Norte (McManus et al., 2003). El hombre y sus animales domésticos (bovinos, ovinos y suinos principalmente) constituyen el hospedador intermediario, y resultan infectados por la ingestión ocasional de los huevos (oncosferas) producidos por la forma adulta del parásito, que se desarrolla en el intestino del perro u otros cánidos (Craig et al., 2007).

DESCRIPCIÓN DEL PARÁSITO

Echinococcus granulosus es un helminto, y dentro de estos se clasifica como platelminto por ser un gusano aplanado, con simetría bilateral, sin cavidad celómica. A su vez, se ubica dentro de la clase Cestoda por presentar cuerpo segmentado y ser exclusivamente parásitos. Dentro de dicha clase, pertenece a la familia Taeniidae (TABLA 1).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género
PLATYHELMINTHES	CESTODA	PSEUDOPHYLLIDEA		
		CYCLOPHYLLIDEA	TAENIIDAE	<i>Taenia</i>
				<i>Echinococcus</i>
			HYMENOLEPIDAE	
			DIPYLIDIIDAE	<i>Dipylidium</i>
			DEVAINAEIDAE	
			MESOCESTOIDIDAE	<i>Mesocestoides</i>
ACANTHOCEPHALA	DIGENEA	ECHINOSTOMIDA	FASCIOLIDAE	<i>Fasciola</i>
NEMATODA	ADENOPHOREA	TRICHURIDA	TRICHURIDAE	<i>Trichuris</i>
	SECERNENTEA	ASCARIDIDA	TOXOCARIDAE	<i>Toxascaris</i>
				<i>Toxocara</i>
		STRONGYLIDA	ANCYLOSTOMATIDAE	<i>Ancylostoma</i>

TABLA 1. Clasificación de *Echinococcus* (Atías, 1999).

La superficie del cuerpo de los platelmintos está cubierta por el tegumento, responsable de la absorción e intercambio metabólico. Por debajo se encuentra el sistema muscular, que reviste toda la extensión del parásito. El mismo es muy

poderoso en las ventosas y faringe. Los cestodos no presentan sistema digestivo. Presentan un sistema nervioso ganglionar cefálico, con troncos nerviosos longitudinales y ranuras transversales con funciones sensitivas y motoras. El sistema excretor funciona además como sistema osmo y termorregulador. Poseen un sistema reproductor complejo y hermafrodita. El aparato reproductor masculino está formado por testículos, un sistema de túbulos que desembocan en glándulas y un órgano copulador retráctil. El aparato reproductor femenino está constituido por ovario, conectado a través del oviducto con el ootipo (lugar donde se producen los huevos). Los huevos pasan desde el ootipo al útero (Atías, 1999). Los platelmintos presentan ciclos evolutivos complejos, con estadios larvarios morfológica y funcionalmente muy distintos de los estadios adultos (Atías, 1999).

Los cestodos tienen el cuerpo es aplanado dorsoventralmente, con forma semejante a cintas por lo que se los denominan gusanos planos o tenias. Presentan una constitución anatómica con escólex, cuello y estróbila. El escólex es la porción anterior del parásito, cuya función es actuar como órgano de fijación, para lo cual posee ventosas, botrias y ganchos. Las ventosas tienen un aspecto redondeado u oval, provistas de una capa muscular gruesa. Las botrias son hendiduras longitudinales, en general dos por escólex. Los ganchos se disponen en círculos en el ápex del escólex, en una zona retráctil llamada rostelo. El cuello es indiferenciado y posee la capacidad de formar el resto del parásito. La estróbila o cuerpo, está constituida por un número variable de proglótidas, que son segmentos cuadrangulares dispuestos longitudinalmente, producidos a nivel del cuello por reproducción asexual (yemación). A medida que se alejan del cuello, las proglótidas van desarrollando su aparato genital, de modo que se pueden distinguir proglótidas inmaduras, maduras y grávidas. Cada proglótida presenta sistema reproductor masculino y femenino, por lo cual pueden fecundarse a sí mismas o lo más común, entre proglótidas que se adosan (Atías, 1999).

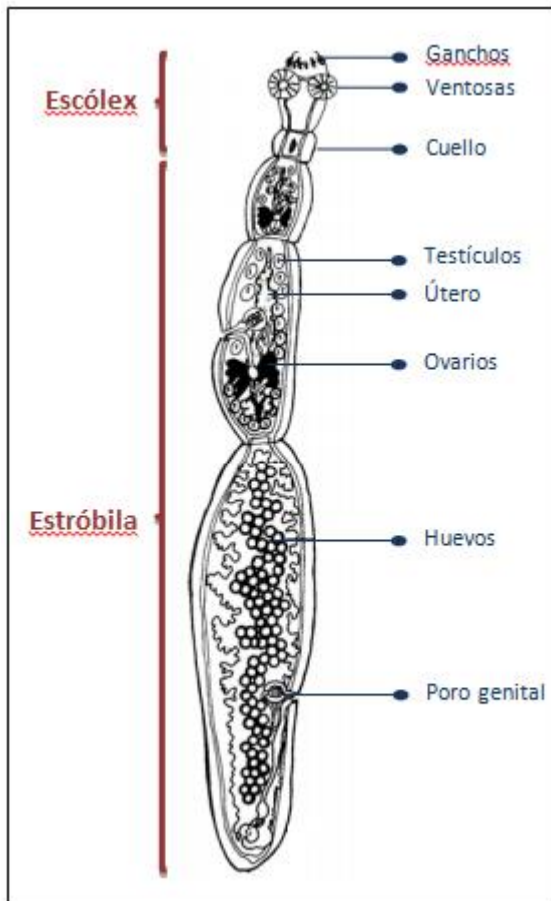


FIGURA 1. Adulto de *Echinococcus granulosus* (adaptado de WHO/OIE, 2002).

El estado adulto (**FIGURA 1**) mide entre 2 a 7 mm de longitud y posee de 2 a 4 segmentos, raramente más de 6. En la parte anterior posee 2 estructuras especializadas, el escólex, con 4 ventosas musculares y el rostelo con 2 coronas de ganchos (30-40 aproximadamente), de tamaños variables (42 a 45 μm en la primera corona y 18 a 38 μm en la segunda). El cuerpo o estróbila, posee una serie de segmentos reproductivos (proglótidas), que varían de 2 a 6. El parásito es hermafrodita, con conductos reproductivos que se abren en un poro

genital lateral, cuya posición varía entre especies y cepas (Thompson, 2001). El penúltimo segmento es maduro, con un poro genital que se abre posterior a la mitad del segmento. La última proglótida es grávida y corresponde a la mitad de toda la longitud del parásito. Después de la fertilización el útero se dilata y ocupa casi todo el segmento cuando los huevos están completamente desarrollados (Thompson, 2001).

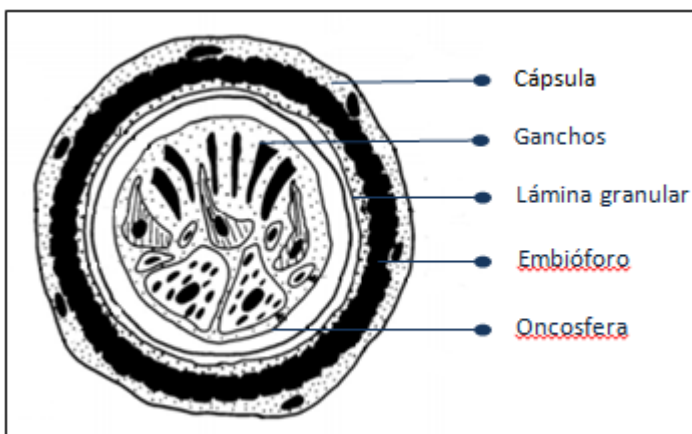


FIGURA 2. Huevos de *Echinococcus granulosus* (adaptado de WHO/OIE, 2002).

Los huevos, de forma ovoide, miden de 30 a 40 μm de diámetro. Consisten en un embrión hexacanto (oncosfera: primer estadio larval), rodeado por varias capas, una de ellas queratinizada, lo cual confiere una alta

larval), rodeado por varias capas, una de ellas queratinizada, lo cual confiere una alta

resistencia y estriaciones oscuras al observarlos al microscopio. Posee además una cápsula exterior que desaparece cuando el huevo es liberado. El huevo de *Echinococcus* es morfológicamente indistinguible de los de otros parásitos del género *Taenia* (Thompson, 2001).

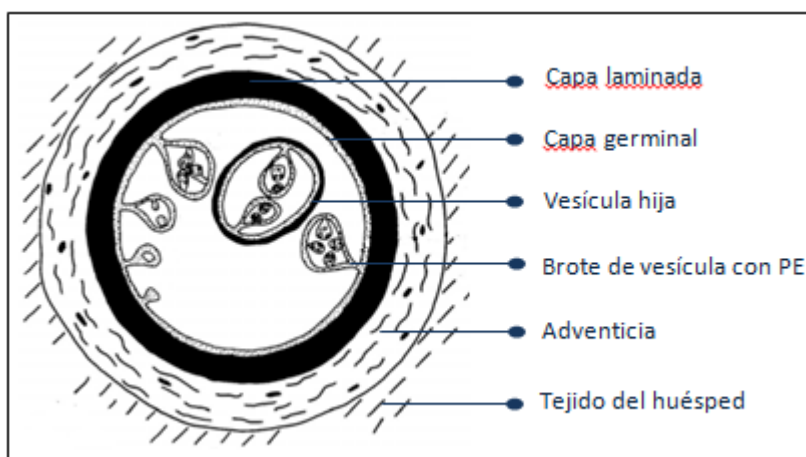


FIGURA 3. Esquema del estadio larval o quiste hidático (adaptado de WHO/OIE, 2002).

El metacestodo (segundo estadio larval), **FIGURA 3,**

consiste en una vesícula o quiste hidático, unilocular, lleno de un líquido incoloro y transparente. Posee dos láminas derivadas del parásito, una interna germinal y otra externa acelular, rodeada por una cápsula adventicial producida por el hospedero, como consecuencia de la respuesta inmune montada por el mismo (Atías, 1999; Moro and Schantz, 2009; Thompson, 2001). La capa laminar externa es rica en carbohidratos y su estructura acelular es única del género *Echinococcus*. Es semipermeable, permite el pasaje de sustancias coloides y cristaloides pero no de gérmenes. La misma encierra físicamente los protoesquistos, que son producidos asexualmente por la capa germinal y constituyen el estado infectivo para el hospedero definitivo. Este proceso se da por yemación de vesículas prolíferas, que liberan hacia el interior del quiste pequeñas vesículas hijas conteniendo 30 a 40 protoesquistos cada una. Cada vesícula hija tiene la misma estructura que la hidátide que la generó, con sus dos capas y capacidad para producir vesículas prolíferas, protoesquistos y líquido hidático (Atías, 1999). Esta forma de producción de protoesquistos por *Echinococcus* spp. asegura una alta carga de parásitos que puede ser ingerida por el hospedero carnívoro definitivo (se calcula que 1 mL de líquido hidático puede contener hasta 400.000 protoesquistos) (Craig et al., 2003; Eckert et al., 2002). Los protoesquistos son ovoides, miden alrededor de 200 µm, presentan una hilera transversal de ganchos refringentes y un escólex invaginado,

que en condiciones favorables se evaginan y continúan su evolución. El quiste crece alrededor de un centímetro por año, pudiendo llegar a medir más de 20 cm, pero en general oscila entre 8 y 15 cm. En el hombre generalmente se desarrolla un único quiste, es poco frecuente observar dos o más en un enfermo, pero en el ganado sí se observan múltiples quistes en hígado y pulmones. El parásito puede calcificarse y morir por causa de fenómenos degenerativos (Atías, 1999).

CICLO BIOLÓGICO

Echinococcus granulosus presenta dos ciclos: uno ancestral selvático y otro, el más importante en la perpetuación de la especie, doméstico. El ciclo selvático involucra lobos y cérvidos, vinculados por una relación predador-presa, que ocurre en el norte de Norteamérica y Eurasia. Este ciclo también se puede presentar entre perros y renos domesticados, en algunas partes de Canadá, Alaska y Rusia (Thompson, 2001). El ciclo doméstico involucra mamíferos ungulados domésticos como hospedadores intermediarios y al perro como huésped definitivo. Existen varios ciclos, todos ellos mantenidos por la irresponsabilidad o desconocimiento del hombre, dentro de estos el más importante es el que se da entre ovejas y perros (Craig et al., 2007; Thompson, 2001). En varias partes del mundo existen, además, animales salvajes que pueden actuar como hospederos, con importancia mínima desde el punto de vista zoonótico. Estos ciclos involucran ungulados y cánidos salvajes como hienas, jacaes y perros de caza, que actúan como hospederos definitivos (Thompson, 2001). El león también ha sido reportado como huésped definitivo en África, único felino que ha demostrado ser capaz de alojar el parásito adulto (Thompson, 2001).

El parásito tiene un ciclo complejo, **FIGURA 4**. El hospedero intermediario se infecta mediante la ingestión de huevos, que son liberados en las heces del hospedero definitivo. Una vez ingerido, por la acción de enzimas digestivas, la oncosfera es liberada del embrióforo queratinizado. Con la ayuda de los ganchos y secreciones de la oncosfera, el parásito penetra la pared intestinal e ingresa a la circulación donde es transportado pasivamente. En la mayoría de los casos quedan retenidos en el hígado,

pero también pueden continuar hacia el pulmón, bazo, riñón, músculo y otras localizaciones más raras. Una vez que la oncosfera llega al órgano destino se desarrolla el estado metacestodo.

El período de desarrollo es variable y puede tomar muchos meses hasta que se produzcan protoescólices (metacestodo fértil). Cada quiste puede contener varios miles de protoescólices, cada uno de los cuales tiene el potencial de generar un parásito sexualmente maduro en aproximadamente 6 semanas, dependiendo de la especie, de la cepa y de la susceptibilidad del hospedero. Esto ocurre en varios mamíferos, como ovinos, bovinos, suinos, caprinos, equinos, camélidos, etc., mientras que el humano se considera un hospedero accidental o aberrante, ya que el parásito pierde en él la capacidad de perpetuarse (Thompson, 2001). Animales carnívoros como perros, lobos y zorros actúan como hospederos definitivos.

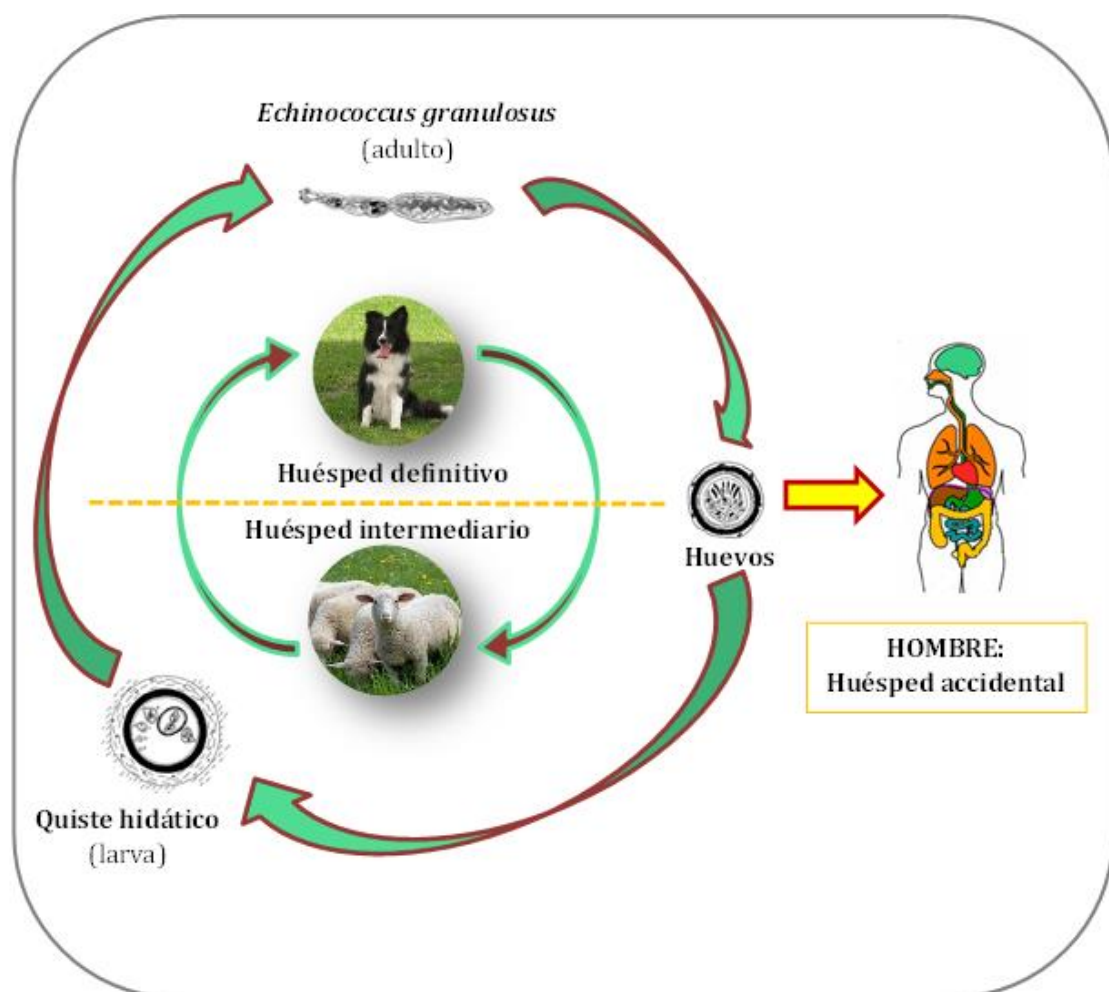


FIGURA 4. Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*. Adaptado de WHO/OIE, 2002.

La maduración sexual del adulto de *Echinococcus granulosus* ocurre en el intestino delgado de los mismos, 4 a 5 semanas después de haber ingerido protoescolices viables. Finalmente, las proglótidas grávidas o huevos aislados son liberados con las heces del animal parasitado. El periodo prepatente comprende desde que ocurre la ingestión de quistes fértiles por el hospedero definitivo hasta que comienza la expulsión de huevos, y dura aproximadamente 35 días (Deplazes et al., 1992). El ciclo se cierra cuando los hospederos intermediarios ingieren uno o más huevos (Zhang et al., 2012).

EPIDEMIOLOGÍA

Echinococcus granulosus tiene una distribución global y se considera una zoonosis emergente o re-emergente en varias partes del mundo, siendo incluida entre la lista de 17 enfermedades tropicales desatendidas de la Organización Mundial de la Salud (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). La incidencia varía enormemente dependiendo de la región, la actividad económica y los patrones socio-culturales, afectando regiones agrícolas y ganaderas principalmente. Las poblaciones afectadas con mayor frecuencia son los trabajadores rurales y sus familias, habitantes de centros poblados pequeños o residentes de áreas de contexto socioeconómico crítico, muchas veces en los cinturones de las ciudades (Irabedra, 2009).

Existen distintas cepas de *E. granulosus*, con variada distribución geográfica y afinidad por diferentes hospederos. Utilizando secuenciación de ADN mitocondrial, se han identificado 10 genotipos distintos, que se denominan según el hospedero que infectan más frecuentemente: 2 cepas ovinas (G1 y G2), 2 bovinas (G3 y G5), una equina (G4), una camélida (G6), una cepa suina (G7), una cérvida (G8), la cepa G9 descrita en cerdos en Polonia y la G10 en Eurasia (Moro and Schantz, 2009). La equinococosis quística es causada comúnmente por la cepa ovina, mientras que otras cepas como la equina o la suina presentan baja o nula infectividad para el hombre (Thompson and McManus, 2002). Esta diversidad genética tiene importancia para el diseño de vacunas, el diagnóstico, la eficacia de los diferentes tratamientos así como

en la epidemiología de la enfermedad debido a la variación en la capacidad infectiva de cada cepa (McManus and Thompson, 2003).

Dado que la población de *E. granulosus* se encuentra en estado adulto en el hospedero definitivo, en estado larval en el hospedero intermediario y como huevos en el medio ambiente, la epidemiología de la enfermedad depende de la dinámica entre estos tres componentes. Por lo tanto, para entenderla, algunas características del entorno deben ser tenidas en cuenta, como por ejemplo, la temperatura y humedad ambiental, los mecanismos de dispersión de los huevos, la capacidad reproductiva del parásito y el grado de inmunidad de los hospederos (Craig et al., 2003). El hombre juega un papel principal en el ciclo de transmisión, al seguir prácticas que facilitan la ingestión de la larva por el perro. El sacrificio de animales en espacios abiertos, en los que los perros tienen acceso a las vísceras del animal, constituye el mecanismo principal que mantiene el ciclo de vida del parásito, ayudado además por falta de conocimiento, condiciones de higiene inadecuadas, la abundancia de perros y la tenencia no responsable de los mismos (Moro and Schantz, 2006). Los factores de riesgo para el humano incluyen el contacto con un ambiente contaminado, especialmente relacionados con mascotas, frutas y verduras contaminadas (quintas no cercadas) y agua de bebida no potable (Craig et al., 2003). La población de contexto socioeconómico crítico es a su vez la más vulnerable a las consecuencias de la enfermedad, por la escasez de recursos y la lejanía, en muchos casos, respecto a los centros de salud, lo que puede demorar su detección y tratamiento. En efecto, cuando la hidatidosis es detectada a tiempo la mortalidad puede ser baja (1-2%), pero esta cifra sube con el diagnóstico tardío. La epidemiología de la enfermedad también ha cambiado con la migración del campo a la ciudad que se ha producido en todos los países de la región, duplicándose en los últimos años el porcentaje de residentes en zonas urbanas. Esto genera focos epidémicos secundarios en los cinturones de las ciudades, en los cuales no existe una infraestructura adecuada, tampoco agua potable para bebida ni para riego de huertas (Irabedra and Salvatella, 2010). Ciertas características del parásito también influyen en la perpetuación del ciclo, como por ejemplo el hecho de que los huevos son altamente resistentes en el medio ambiente, pudiendo permanecer infectivos por varios meses, incluso hasta un año, a bajas

temperaturas. Sin embargo, son sensibles a la desecación, con una humedad relativa del 25% mueren en 4 días y de 0% en 1 día (Thompson, 2001). A pesar de esta pérdida de viabilidad, estudios realizados en Argentina demostraron la persistencia de la reactividad antigénica luego de 3 años de permanencia en clima árido (Sanchez Thevenet et al., 2003). El calentamiento a 60 - 80°C los mata en menos de 5 minutos, pero por otro lado, sobreviven a muy bajas temperaturas (Thompson, 2001).

La enfermedad implica también consecuencias económicas, con costos diagnósticos, de tratamiento médico y quirúrgico, de internación y medicación, por pérdida de días de trabajo, abandono de actividades rurales, etc. (Battelli, 2004). El desarrollo larval en el ganado también conlleva pérdidas para la economía del país y de las familias rurales, con disminución en la producción de leche, lana y carne (Torgerson, 2003). En un estudio del impacto económico de la equinococosis quística en la región (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay), realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 2007, se estimó que las pérdidas totales eran de alrededor de 75 a 96 millones de dólares anuales (Irabedra et al, 2007) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que a nivel global los costos de tratamiento y pérdidas en la producción animal alcanzarían los 2.000 millones de dólares (Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/HTM/NTD/NZD/2011.2)).

En América Latina los países que presentan índices más elevados de infección son Argentina, Chile, Uruguay, sur de Brasil y Perú. Se estima que alrededor de 2.000 casos nuevos por año son notificados por estos 5 países (Larrieu and Zanini, 2012). En el resto del mundo se reportan índices importantes en el litoral Mediterráneo, en el sur y centro de la Unión Soviética, en Asia Central, China, Australia y partes de África (Moro and Schantz, 2009), estimándose que a nivel global se produce anualmente una pérdida de 1 - 3 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALY) (Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/HTM/NTD/NZD/2011.2)).

En Uruguay, la enfermedad se presenta en forma endémica en zonas rurales. En humanos, se estima, por estudios ecográficos realizados en los años 2006 y 2007, que un 1% a 2% de la población general de zonas de riesgo, presenta imágenes quísticas (zonas rurales, centros poblados pequeños y zonas de contexto socioeconómico

crítico), con aparición de quistes hidáticos hialinos en niños, lo que demuestra que, a pesar de las campañas de control, no se ha producido aun un corte en la transmisión de la enfermedad (Irabedra, 2009; Irabedra and Salvatella, 2010). En el año 2004, se realizó un relevamiento de equinocosis canina, utilizando un kit comercial de coproELISA, encontrándose que un 4,3% de los perros ensayados presentaron resultados positivos. En cuanto al ganado, según el informe anual del 2011 realizado por la Dirección General de Servicios Ganaderos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, a la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), un 5,5% de los bovinos analizados en frigoríficos contenía quistes hidáticos, mientras que en ovinos y suinos el porcentaje fue de 2,2 y 0,6%, respectivamente (http://www.mgap.gub.uy/DGSG/InformacionEpidemiologica/InformesAnualesOIE/Informe_OIE_Anual_2011).

Argentina presenta tres regiones con alta incidencia, relacionadas a la producción de ovinos. Una de las regiones es la patagónica, al sur del país; otra la provincia de Buenos Aires y por último la región litoral este. Aparte de estas regiones, se encuentran focos de la enfermedad en todas las provincias del país. Según el Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación, la tasa de notificación de casos por 1.000.000 habitantes en el año 2010 fue de 3,09, mientras que en el año 2011 aumentó levemente a 3,68. Las tasas más elevadas se registraron en la región noroeste, en Tierra del Fuego, Neuquén, La Pampa y Chubut. En tanto que en perros, un estudio realizado en la provincia de Río Negro en el año 2005, sobre 1.042 animales, encontró un 7,3% de positivos utilizando una prueba de coproELISA de desarrollo local (Cavagion et al., 2005).

Chile parece tener una incidencia estable desde 1992 de 2 a 2,5 por 100.000 habitantes con una mortalidad de entre 0,3 y 0,4 por 100.000 habitantes. Las regiones australes XI y XII concentran la mayor actividad ganadera del país y por ende las tasas más altas de la enfermedad. Presenta además entre 4,4 y 13,3 % de perros positivos, dependiendo de la región y un 7,5% de positividad en animales beneficiados entre 1990-2000. Las áreas más afectadas corresponden a Arauco (50,5%), Araucanía (25,3%), Antofagasta (22,3%), Osorno (21,9%), Aysén (21,4%) y Ñuble (20,8%) (OPS, 2004).

Brasil no cuenta con buena información sobre esta enfermedad, si bien es sabido que hay casos esporádicos en la mayoría de los estados, así como que el Estado de Río Grande do Sul es el área endémica más importante del país (OPS, 2004). El último reporte de la Secretaría de Agricultura del Estado de Río Grande del Sur data de 1997 e informa entre 14 a 50% de perros positivos en zonas rurales. En cuanto los casos humanos los datos reportados por los organismos públicos no reflejan la realidad de la patología en el país, ya que no es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo cual los datos disponibles no son confiables. Sí es bien conocida la incidencia en ganado, debido a estudios realizados en frigoríficos y se sitúa en 12% en bovinos, mientras que en ovinos ha ido en aumento en los últimos 10 años, pasando de 2,46% a 17,09% (de la Rue, 2008).

Estas cifras son superadas en otras regiones de nuestro continente, donde hay zonas altamente endémicas. Perú es, probablemente, el país de la región con mayor incidencia y prevalencia de hidatidosis, presentando tasas de hasta 79/100.000 habitantes en Pasco y de 39/100.000 habitantes en Huancavelica. Como ejemplo, en las zonas andinas de Perú, llegan a registrarse valores de hasta 9,3% de imágenes abdominales positivas, con infecciones en perros de 46 - 88% y más del 80% de afectación del ganado bovino y ovino (Moro and Schantz, 2006). Otro país del continente con alta ocurrencia de hidatidosis es Bolivia, que presenta altas tasas de incidencia en zonas ganaderas localizadas en los valles de los departamentos de Potosí, Cochabamba y Tarija (Irabedra and Salvatella, 2010).

VIGILANCIA DE LA HIDATIDOSIS

Es difícil definir la prevalencia de esta zoonosis, dado que por su naturaleza, la misma es, a menudo, monitoreada por al menos dos dependencias gubernamentales. Por un lado, autoridades de salud pública se encargan del problema médico (tratamiento y cirugía de enfermos con quiste hidático), y por otro, el ministerio de ganadería se preocupa de las implicancias veterinarias (sobre todo del ganado). En muchos casos hay poca comunicación entre ambas instituciones y es complicado establecer una

figura de la enfermedad (Craig et al., 2003). En nuestro país se suma además, la existencia de la Comisión Nacional de Zoonosis (CNZ), que investiga la infección a nivel de perros y realiza ecografía en humanos. Para conocer la epidemiología de la enfermedad se puede realizar el diagnóstico a nivel de los distintos hospederos.

DIAGNÓSTICO EN EL HOSPEDERO INTERMEDIARIO

En el hospedero intermediario el diagnóstico generalmente es post mortem y se lleva a cabo en plantas frigoríficas. Esto genera datos subestimados de la equinocosis ya que los animales que llegan a los frigoríficos son jóvenes y tienen menor prevalencia que los animales viejos; además, el ganado que se va a vender (muchas veces para exportación) se encuentra en mejores condiciones (Torgerson and Deplazes, 2009). Las técnicas de ultrasonido se han aplicado también para el diagnóstico animal, pero al igual que ocurre en humanos, permiten detectar quistes hepáticos pero no pulmonares. Por otra parte, presentan una sensibilidad baja de alrededor de 54%, aunque la especificidad es elevada (94%), según estudios realizados en Kenia (Sage et al., 1998). El diagnóstico radiológico también ha sido utilizado con éxito pero sólo a pequeña escala, no resulta aplicable para estudios epidemiológicos de gran cantidad de animales (Craig et al., 2003). Por otro lado, el diagnóstico serológico, empleando métodos inmunológicos, también presenta parámetros de sensibilidad y especificidad no adecuados para su uso, si bien se han mejorado los mismos utilizando líquido hidático total en inmunoensayos, alcanzando una sensibilidad de 89% y una especificidad de 78,6% (Gatti et al., 2007). La baja especificidad se atribuye a la reactividad cruzada con otras tenias como *T. ovis* y *T. hydatigena* (Torgerson and Deplazes, 2009).

DIAGNÓSTICO EN HUMANOS

La hidatidosis tiene un largo período asintomático, debido a lo cual, la disponibilidad de métodos que permitan un diagnóstico temprano y certero es crítica, ya que de esto depende la realización de un tratamiento apropiado y a tiempo. Esto es difícil

porque en general la prevalencia de la enfermedad es baja y aun contando con métodos con buena especificidad se pueden originar muchos falsos positivos (valor predictivo positivo bajo). El diagnóstico por imágenes, en particular la ultrasonografía, se ha transformado en el método más versátil para el diagnóstico de la cavidad abdominal, complementándose con la radiografía para el diagnóstico de quistes pulmonares. También se han empleado técnicas de mayor definición como tomografía computada y la resonancia nuclear magnética para la confirmación diagnóstica. La reducción de tamaño de los equipos de ultrasonografía ha permitido realizar el análisis aún en lugares remotos, y ha promovido el estudio en poblaciones asintomáticas. Las dificultades que presenta este método es que no todos los países cuentan con recursos para adquirir el equipamiento necesario y algunos tampoco poseen personal calificado suficiente para llevarlo adelante. Además, no permite la detección de quistes pequeños, ni quistes localizados en pulmones, huesos o sistema nervioso central (Brunetti et al., 2011; Craig et al., 2003).

La serología ha mostrado su utilidad sobre todo como confirmación del diagnóstico por imágenes y para el seguimiento del tratamiento con quimioterapia (Zhang et al., 2012). La mayoría de los métodos serológicos detectan anticuerpos específicos, principalmente IgG, acompañados por IgM, IgA e IgE en algunos casos (Zhang et al., 2012) y se han montado en distintos formatos, incluyendo ELISA, inmunolectroforesis (IEF) e inmunoblot (IB), que utilizan mayoritariamente líquido hidático total o fracciones parcialmente purificadas, antígeno B (AgB) nativo o distintas subunidades del mismo en forma recombinante. Existen numerosos reportes describiendo el valor diagnóstico de estos y otros antígenos, pero la comparación se hace muy difícil debido a las diferentes serotecas utilizadas. Por ejemplo, los valores reportados para el líquido hidático en distintos laboratorios varían en rangos de 31-96% de sensibilidad y 41 - 100% de especificidad, lo cual genera un panorama ciertamente confuso y se refleja en el hecho de que ninguno de los métodos existentes sea ampliamente aceptado por los médicos clínicos (Zhang et al., 2012). Una comparación de seis de los principales antígenos usados en este diagnóstico, realizada en el marco de un estudio multicéntrico a doble ciego, que involucró a 5 países de nuestra región, una misma seroteca, analizada en 6 laboratorios, mostró que tres de estos antígenos, líquido

hidático, AgB y su subunidad AgB8/1, mostraban niveles de sensibilidad y especificidad similares cuando se utilizaban curvas ROC (Receiver Operating Characteristic curves) para establecer el valor de corte del ensayo (Lorenzo et al., 2005).

DIAGNÓSTICO EN EL HOSPEDERO DEFINITIVO

La técnica de oro para este diagnóstico es el examen parasitario post mortem. Éste es 100% específico y el mejor método cuantitativo, pero plantea problemas éticos, es evidentemente laboriosa, riesgosa y no apta para estudiar un gran número de animales. Existen otros métodos que comprenden: a) la purga de los animales con bromhidrato de arecolina, seguida de la examinación de las heces en busca de parásitos; b) la detección de anticuerpos en suero; c) la detección de material genético del parásito mediante técnicas de PCR, coproPCR y d) la detección de antígenos parasitarios en la heces mediante inmunoensayos, coproELISA.

A) Purgación con bromhidrato de arecolina

El examen directo de las muestras fecales (coproparasitario) obtenidas por defecación natural de los perros, permite diagnosticar la presencia de huevos de cestodos pero no es posible diferenciar morfológicamente entre las distintas tenias. Además, la emisión de huevos es errática, y su producción requiere de un tiempo de desarrollo del gusano de aproximadamente un mes post infección, siendo inútil en el período prepatente (Jenkins et al., 2000). Debido a esto, este análisis tiene muy poco valor diagnóstico, y se sustituyó por métodos de purga.

La purgación con bromhidrato de arecolina es altamente específica, pero es muy laboriosa y operador-dependiente, conlleva riesgos para el técnico, el ambiente en el que se realiza y para el perro. Por las complicaciones asociadas es a menudo resistida por los dueños de los canes. Su sensibilidad es variable y en general baja, sobre todo en perros con baja carga parasitaria, también debido a que la droga no siempre logra un vaciado intestinal adecuado (falla en 10 - 20% de los casos). La arecolina produce

dos efectos deseados para realizar el diagnóstico: por estimulación parasimpaticomimética provoca aumento del peristaltismo intestinal, y además ejerce una acción depresora en las tenias que favorece su desprendimiento de la mucosa intestinal. El examen del contenido intestinal, post purgación con arecolina, depende de la paciencia y experiencia del operador, pudiéndose detectar hasta un único parásito si el análisis se realiza minuciosamente. Como en todas las técnicas, el valor predictivo disminuye a medida que decrece el porcentaje de perros infectados, como ocurre en las etapas avanzadas de los programas de control aplicados (Cavagion et al., 2005).

El procedimiento consiste en administrarle al animal 4 mg/kg de bromhidrato de arecolina, por vía oral; lo cual provoca la purga en aproximadamente 30 minutos. Algunos perros pueden necesitar una o dos dosis más para tener una purga exitosa (máximo 3 dosis). El contenido intestinal es examinado, en un principio, en el campo bajo condiciones de bioseguridad adecuadas y con ayuda de lupas. Las muestras son luego recolectadas en solución salina con 5% de formol. Se hierven durante 10 minutos y se tamizan utilizando filtros de 150 µm. Estas muestras son analizadas nuevamente en bandejas de fondo oscuro y con microscopio de disección, determinando la ausencia/presencia de *E. granulosus*, conteo y la presencia de otros parásitos (Craig et al., 1995).

B) Detección de anticuerpos en suero

A pesar de su ubicación en el lumen intestinal, existe una respuesta de anticuerpos contra componentes del parásito que ha sido utilizada con fines diagnósticos. Utilizando antígenos de protoescolices se encontró inicialmente una especificidad de 91,8% y una sensibilidad de 72,7% con muestras confirmadas post mortem; pero al analizar muestras de campo en Kenia, la sensibilidad encontrada fue muy baja, 40% (Gasser et al., 1988; Jenkins et al., 1990).

En un estudio realizado en Uruguay (Craig et al., 1995) que comparó coproantígenos, anticuerpos en suero (IgG, IgA e IgE) y purgación con bromhidrato de arecolina, se encontró una sensibilidad de 34,6% para ELISA IgG, 46,2% para IgA y 38,5% para IgE. La

sensibilidad aumenta a 69,2% si se consideran combinaciones de las tres inmunoglobulinas positivas. No se encontró relación entre la carga parasitaria y los valores de densidad óptica (DO), como se puede ver en algunos coproELISAs. La baja sensibilidad ha sido confirmada en estudios posteriores, lo cual no resulta extraño teniendo en cuenta la localización del parásito y los posibles efectos moduladores de la respuesta inmune que esto pueda ejercer. Por otro lado, este ensayo no permite diferenciar entre infección actual o pasada (Craig et al., 2003; Deplazes et al., 1992).

C) coproPCR

La técnica está dotada de la especificidad característica de la reacción de PCR y puede utilizarse también para monitorear los genotipos circulantes. Se han observado algunos problemas durante la extracción de ADN proveniente de las materias fecales, ya que éstas contienen sustancias inhibidoras que provocan la aparición de falsos negativos (Torgerson and Deplazes, 2009). Se han descrito algunos métodos para eliminar dichas sustancias, pero ello implica procedimientos complejos, prolongados y pérdida de parte del ADN de la muestra. También se han realizado pruebas para concentrar los huevos de las heces, mejorando la sensibilidad pero con protocolos complicados, no aptos para el estudio de grandes cantidades de muestras (Craig et al., 2003). La primera PCR para detección de ADN en materias fecales caninas fue optimizada por (Abbasi et al., 2003). La misma amplifica secuencias repetidas en el ADN de la cepa ovina (fragmento de 133 pares de bases), que es la más frecuente a nivel mundial y la que afecta al hombre más a menudo. Presenta especificidad de especie ya que da negativa con muestras con *E. multilocularis*. Puede llegar a ser muy sensible, detectando muestras hasta con 2 parásitos, y no da lugar a falsos positivos con muestras con *T. hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis*, *D. caninum*, *Toxocara canis* y *Mesocostoides* spp. Otros métodos amplifican la región mitocondrial 12S del ARNr (Dinkel et al., 2004; Stefanic et al., 2004), con especificidad exclusiva para la cepa ovina en el método de Stefanic y colaboradores, o mediante una PCR/semi anidada que incluye además del genotipo G1, los G5, G6, G7 en el primer caso.

La PCR de Stefanic y colaboradores detecta ADN de los huevos de la cepa ovina de *E. granulosus* con alta especificidad. Cuando se analizaron muestras de otras cepas de *E.*

granulosus, *E. vogeli*, varias tenias (*T. pisiformis*, *T. hydatigena*, *T. multiceps* y otras), *D. caninum*, *T. canis*, *Trichuris vulpis* y otros parásitos, no se observaron resultados positivos. En cuanto a la sensibilidad, dentro de las 5 muestras con resultado positivo, 4 contenían *Echinococcus* spp.; el perro que dio negativo presentaba *E. multilocularis*. Además, se testearon 8 animales que contenían *Echinococcus* spp. y *Taenia* spp., de los cuales 4 resultaron positivos. Los 3/4 restantes negativos correspondían a *Echinococcus* spp. diagnosticados por arecolina, lo cual, al desconocer su carga parasitaria, no permite evaluar la sensibilidad de la técnica. El desempeño de estas tres PCRs fue evaluado con un panel de muestras fecales recogidas de perros que fueron también diagnosticados por necropsia (Boufana et al., 2008). Se analizaron muestras con *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, otros cestodos como *D. caninum*, *T. hydatigena*, *T. ovis*, entre otros y otras tenias (*T. solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis diminuta*). Se probaron también distintos genotipos de *E. granulosus* (G1, G4, G5, G6, G7, G8 y G10). Los primers de Dinkel y Stefanic dieron lugar a las PCRs más sensibles (73,7% y 100%, respectivamente). Los primers de Abbasi detectaron sólo un 52,6% de los perros infectados con *E. granulosus*, varios de los falsos negativos correspondían a animales con menos de 200 parásitos. Asimismo, los tres métodos fueron capaces de detectar parásitos en el período prepatente: 21 - 27 días post infección (dpi) Abbasi, 30 - 37 dpi Stefanic y 30 dpi Dinkel. En cuanto a la especificidad, la PCR de Abbasi fue la que mostró mayor especificidad relacionada a las diferentes especies (90,9%), si bien presentó una fuerte banda de 133 pb con muestras con *E. shiquicus*. Esto último es contradictorio con la publicación original de (Abbasi et al., 2003), en la cual la PCR se reportó como 100% específica, pero no había sido probada con esta especie de *Echinococcus*. Por otra parte, los primers de Stefanic fueron los que presentaron menor especificidad, 27,3%, observándose bandas positivas en muestras con *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *T. hydatigena*, *T. multiceps*, *T. ovis*, *T. pisiformis*, *D. caninum* y *T. solium*. La PCR de Dinkel presentó una especificidad de 63,9%, amplificando muestras con ADN de *E. shiquicus*, *T. hydatigena*, *T. multiceps*, *T. ovis* y *T. pisiformis*. Los tres ensayos fueron capaces de detectar hasta un único huevo de *E. granulosus*, mientras que el límite de detección con respecto a los parásitos fue 4 para las PCRs de Stefanic y Dinkel y 130 para la de Abbasi. Con respecto a los genotipos de *E. granulosus*, el test de Dinkel evidenció especificidad para el genotipo G1, mientras

que la de Abbasi amplificó ADN proveniente de los genotipos G1, G4, G5, G7 y G10 y la PCR de Stefanic presentó la banda característica de 255 pb en todos los genotipos estudiados. En conclusión, la PCR diseñada por Abbasi, a pesar de no ser específico para el genotipo G1, presentó una alta especificidad en cuanto a especies y puede resultar útil en el diagnóstico confirmatorio. Por otro lado, la PCR de Dinkel tuvo el potencial de ser específica para la cepa ovina de *E. granulosus* en el 100% de las materias fecales caninas. En cuanto a la PCR de Stefanic, si bien mostró una sensibilidad de 100%, presentó en este trabajo una baja especificidad.

Se considera entonces, que éstos métodos moleculares son costosos, consumen mucho tiempo y no resultan apropiados para estudios a gran escala. No deben utilizarse como una estrategia de *screening* pero sí son la mejor herramienta para realizar diagnóstico confirmatorio de aquellas muestras que resulten positivas en el coproELISA (Torgerson and Deplazes, 2009).

D) coproELISA

Los helmintos que infectan el intestino canino liberan productos de excreción/secreción que aparecen en las heces del hospedador. Estos compuestos incluyen glicoproteínas y complejos carbohidratos de alto peso molecular (Elayoubi and Craig, 2004; Elayoubi et al., 2003), que pueden ser detectados en un ELISA “sándwich”, siempre y cuando se disponga de los anticuerpos adecuados. Hay pocos estudios de caracterización de estos componentes. El análisis de los sobrenadantes de materias fecales de perros con y sin *E. granulosus*, mediante FPLC (fast protein liquid chromatography), reveló la presencia de 2 componentes mayoritarios de peso molecular >670 kDa y de 146-440 kDa, respectivamente. El SDS-PAGE de estas fracciones, en condiciones de reducción, no mostró ninguna banda. Bajo condiciones de no reducción, la tinción con plata evidenció una banda, negativamente teñida, de 155 kDa en la fracción de 146-440 kDa, presente en las muestras positivas pero no en las negativas. Asimismo, el análisis de las muestras por Western blot, utilizando suero hiperinmune anti *E. granulosus* total, muestra reconocimiento de esta banda de 155 kDa en las muestras positivas. El estudio mediante Western blot, después del tratamiento con periodato, de la fracción de 146-440 kDa, eliminó completamente la

unión del suero hiperinmune anti *E. granulosus* a la banda de 155 kDa, lo cual resaltó la importancia de los carbohidratos en la antigenicidad de dicha molécula coproantigénica. Este resultado fue confirmado también mediante tratamiento de las materias fecales con periodato, separación por FPLC y posterior análisis por ELISA, observándose pérdida de la actividad antigénica de la fracción mencionada. Estas fracciones de muestras positivas también fueron comparadas con distintos extractos de adultos de *E. granulosus*, con el fin de identificar la fuente de los coproantígenos detectados. Dos de las fracciones separadas por FPLC del extracto total del parásito, mostraron un perfil de ELISA exactamente igual al observado en los sobrenadantes de muestras positivas. Se removió el tegumento en el extracto mencionado más arriba y se encontró un componente antigénico fuerte similar a la fracción de >670 kDa, lo cual sugiere que la actividad de la fracción de 146-440 kDa está relacionada probablemente con antígenos de la superficie del parásito. Por su lado, los extractos de material de excreción/secreción del parásito presentan mayor actividad antigénica en la fracción >670 kDa, documentando también la importancia de estos antígenos en la actividad coproantigénica detectada mediante ELISA (Elayoubi and Craig, 2004). El estudio de los coproantígenos de *Echinococcus* ha mostrado que los mismos son estables frente al calor, resisten la degradación por parte de enzimas fecales, son insensibles a las proteasas, y susceptibles a ser degradados por tratamiento con periodato de sodio. Además permanecen activos luego de que las muestras son almacenadas en buffer fosfato salino - 10% de formol por meses. Estas características resultan de importancia, pues permite tomar muestras ambientales, que pueden haber permanecido quizás por varios días en el suelo, y ser analizadas por coproELISA. Esto último se puede utilizar para obtener información sobre predios con transmisión activa, recolectando muestras secas del suelo de un establecimiento (Cavagion et al., 2005). Los coproantígenos tienen otras características adicionales que resultan útiles para realizar estudios epidemiológicos. Se detectan antes del período prepatente y, dependiendo de la carga parasitaria, pueden comenzar a evidenciarse a los pocos días post infección (dpi). Este es un punto importante para las campañas de control, ya que permite detectar perros positivos antes de que comience el período expulsivo de huevos al medio ambiente (Jenkins, 2006). En general, existe una relación directa entre la DO del ensayo y la carga parasitaria del animal. Presenta la ventaja, frente a la detección de anticuerpos

en suero, de volverse indetectables 2 a 3 días post tratamiento con praziquantel, mientras que los anticuerpos permanecen positivos por varios meses. Como se ha comentado, resisten frente a diferentes condiciones ambientales, como la exposición directa al sol entre 26 - 28,5°C por al menos 6 días y el almacenamiento a -20°C durante un año, sin agregado de inhibidores de proteasas. Persisten luego de hervir las materias fecales durante 30 minutos, lo cual resulta de vital importancia para la bioseguridad durante el análisis de las muestras (Jenkins et al., 2000).

Como ocurre a menudo con otros antígenos de helmintos, los coproantígenos presentan motivos que pueden dar lugar a reactividad cruzada con antígenos de otros parásitos intestinales. Así mismo, se han reportado problemas de reactividad cruzada con otros compuestos encontrados en las materias fecales (Elayoubi and Craig, 2004). Por otra parte, la sensibilidad está muy relacionada con la carga parasitaria del animal, tanto en perros infectados experimentalmente como en la infección natural. Se observa un gran aumento de la sensibilidad cuando el perro posee más de 100 parásitos, lo cual influye y dificulta la comparación de parámetros entre diferentes coproELISAs y publicaciones, cuando se usan muestras de alta o baja carga (Christofi et al., 2002; Torgerson and Deplazes, 2009). Asimismo, los parámetros de sensibilidad y especificidad varían en diferentes situaciones epidemiológicas, dependiendo del tipo de parásitos que se encuentran en el ambiente en cuestión y de la prevalencia (Pierangeli et al., 2010; Torgerson and Deplazes, 2009). Debido a esto, en países con baja prevalencia, sólo un pequeño porcentaje de los positivos serán verdaderos positivos, mientras que casi el 100% de los negativos serán verdaderos negativos. Esto puede llevar a una sobreestimación de la prevalencia del país o zona estudiada y debe ser tenido en cuenta por los programas de control.

Los anticuerpos, que constituyen la base de los ensayos, son los que determinan las características finales del mismo y de su cuidadosa selección dependerá por tanto, el valor diagnóstico del mismo (Deplazes et al., 1992). Los distintos métodos reportados al momento utilizan mayormente anticuerpos policlonales (AcPo) que han sido preparados contra antígenos somáticos o de excreción/secreción (E/S) del helminto. Debido a que los coproantígenos vinculados a *E. granulosus* comparten epitopes con agentes causales de otras parasitosis, muchas veces de gran prevalencia, los

fenómenos de reactividad cruzada son un problema difícil de controlar en estos ensayos. Una mayor especificidad se logra incorporando anticuerpos monoclonales (AcMo) seleccionados en base a parámetros de sensibilidad y especificidad, y es común encontrar métodos que combinan el uso de anticuerpos policlonales para la captura, y anticuerpos policlonales o monoclonales para la detección (Malgor et al., 1997). Incluso, puede ocurrir que el anticuerpo monoclonal utilizado haya sido preparado contra antígenos de una especie altamente relacionada, como es el caso del ensayo desarrollado por Malgor y colaboradores, que utilizan un anticuerpo monoclonal generado contra antígenos de *E. multilocularis* (Malgor et al., 1997).

Numerosos ensayos de detección de coproantígenos han sido descritos a la fecha, con distintos parámetros de sensibilidad y especificidad que varían entre 63-100% y 91-98%, respectivamente, los cuales resultan difíciles de comparar debido a que han sido ensayados con distintas muestras (Allan et al., 1992; Casaravilla et al., 2005; Deplazes et al., 1992; el-Shehabi et al., 2000; Malgor et al., 1997). Si es interesante revisar la comparación del valor diagnóstico de los métodos de detección de coproantígenos, cuando la misma se realiza utilizando el mismo conjunto de muestras. Así por ejemplo, se ha encontrado una sensibilidad global del método de coproELISA del 83% y del 76% para la purgación, en relación al diagnóstico realizado por necropsia (Allan and Craig, 2006). Así mismo, en un estudio realizado en Túnez (Lahmar et al., 2007) se comparó el desempeño de la purgación con arecolina, un ensayo de coproELISA y un método de coproPCR utilizando muestras de necropsias de perros infectados experimentalmente, en período prepatente (**FIGURA 5**). El coproELISA en este caso, utilizaba un AcPo contra extractos del adulto de *E. granulosus* para la captura, y el mismo anticuerpo conjugado con peroxidasa para la detección. La PCR empleada fue la Abbasi et al., 2003, descrita anteriormente. Se infectaron 65 perros con *E. granulosus*, de los cuales 58 fueron confirmados por necropsia. Con respecto a los resultados de la purgación, 28 tuvieron una purga exitosa con una única dosis y 22 con una segunda dosis (efectividad total de 76,9%). Después de la primera dosis de arecolina 16 fueron positivos para *E. granulosus*, lográndose una sensibilidad muy baja de 27,6%, que aumentó a 48,3% con dos dosis del purgante (28/58).

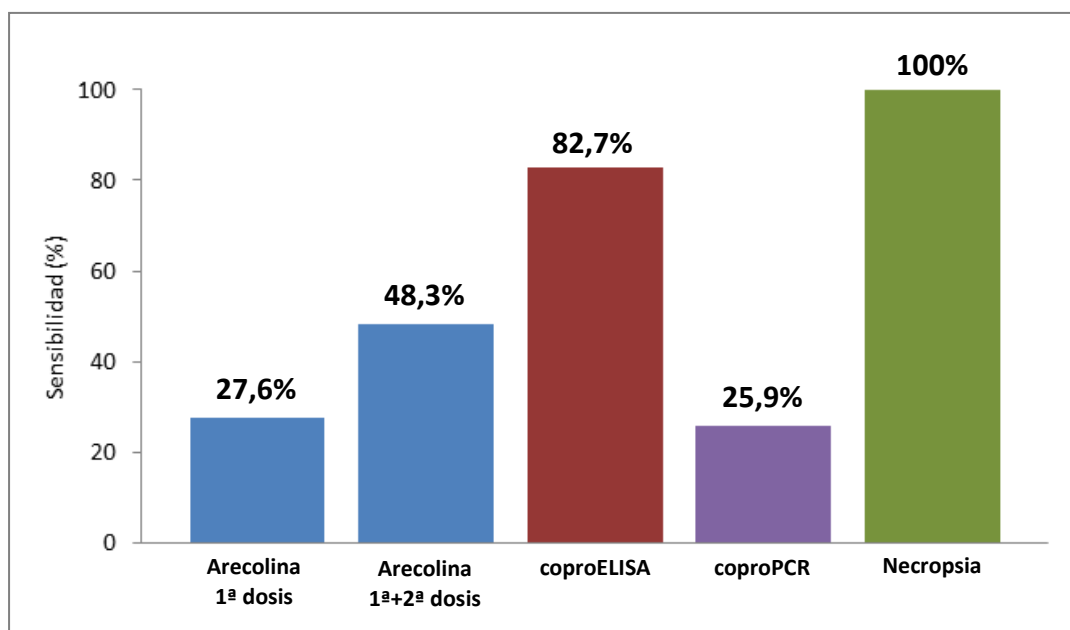


FIGURA 5. Comparación de técnicas diagnósticas en materia fecal canina. Se muestran los resultados obtenidos por Lahmar et al., 2007, donde se compara la sensibilidad obtenida con las distintas técnicas de diagnóstico, utilizando un mismo panel de materias fecales.

En lo que respecta al coproELISA, 48/58 perros resultaron positivos, 82,8%, entre los días 21 - 33 post infección. Dentro de éstos, dos fueron falsos positivos, uno de ellos con *Toxocara canis*, arrojando una especificidad de 80%. Estos valores se correlacionan con los encontrados por Allan and Craig, 2006, descritos anteriormente. Dentro de los falsos negativos, 6/10 tenían menos de 100 parásitos y el resto fueron necropsiados antes del día 28 post infección. El VPP fue 96% y el VPN fue un poco bajo, 44%. Por otro lado, 15/58 perros fueron positivos por coproPCR (25,9%), observándose mayor positividad en perros con mayor carga parasitaria. Con esta última técnica, todos los perros negativos fueron clasificados como tal, indicando una especificidad del 100%.

Si bien los reportes aislados de los distintos métodos pueden dar lugar a confusión respecto a qué técnica utilizar, los estudios de comparación interna, con un mismo grupo de muestras, sistemáticamente demuestran que la detección por coproELISA resulta ser el método de mayor utilidad, por su practicidad, procesamiento en paralelo

de numerosas muestras, menor riesgo biológico para los técnicos y el medio ambiente, y por el balance entre los parámetros de sensibilidad y especificidad que posee (Craig et al., 2003; Deplazes et al., 1992; Lahmar et al., 2007; Lopera et al., 2003).

PROGRAMAS DE CONTROL

La hidatidosis es una enfermedad prevenible, tratable y eliminable como lo demuestran algunos ejemplos en los cuales la enfermedad ha sido erradicada. Hasta el presente, cinco islas, Islandia, Nueva Zelandia, Tasmania, las Falklands y Chipre, lograron instrumentar Programas de Control que eliminaron la enfermedad (Craig et al., 2007; Torgerson and Deplazes, 2009). Estos programas de control son multifactoriales, pero tienen como componentes esenciales la educación de la población que evite el acceso de los perros a las vísceras no tratadas, así como la importancia del lavado de manos, el control y desparasitación de la población canina con praziquantel y actualmente, se está considerando posibilidad de incluir la vacunación del hospedero intermediario (ovino). Estas medidas, deben ser sostenidas en el tiempo para surtir efecto y algunos de los programas que han resultado exitosos se han prolongado por décadas (Heath et al., 2006). Los programas de control son muy difíciles de implementar y muy costosos de mantener, y en los países continentales tienen el componente adicional del peligro de reinfección debido a la permeabilidad de sus fronteras. Los principios generales de los programas de control fueron diseñados en 1986 y consisten en 4 etapas: a) preparación, organización y diagnóstico, b) ataque, c) consolidación y d) vigilancia epidemiológica.

Actualmente, se están revisando estos principios para darle un nuevo enfoque a dichos programas. Estas medidas incluyen, por ejemplo, vacunación del ganado, adaptación de los programas educativos, uso de antiparasitarios más efectivos, como el oxfendazol, mejorar el diagnóstico en perros y humanos (incluyendo la detección de coproantígenos en perros), el posible uso de vacunas contra el parásito en perros y la utilización de métodos matemáticos que simulan las intervenciones con mejor costo-efectividad. Se espera que con estos cambios se acorte el tiempo de la fase de ataque

y se mejore la vigilancia en la fase de consolidación. Algunas de estas medidas se han llevado a la práctica. Investigaciones con los modelos matemáticos indican que la vacunación del 90% de la población ovina es una estrategia de control eficiente. Sin embargo, la intervención más efectiva es el uso de vacunación ovina más tratamiento antihelmíntico en perros (Craig et al., 2007). Es relevante también conocer las variantes genéticas que circulan en el país, debido a que esto puede influir en el ciclo biológico del parásito, la tasa de desarrollo, la antigenicidad, la transmisión, la sensibilidad a los fármacos y la patología. Por lo tanto, puede tener implicancias en el diseño de vacunas, diagnóstico, drogas utilizadas en el programa, aunque aún no existe evidencia concreta de estos efectos (Craig et al., 2007).

En los países con altos índices de infección de América del Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Perú y Uruguay), las condiciones ideales para la mantención del ciclo del parásito están dadas por la existencia de establecimientos ganaderos ovinos asociados a perros pastores, mataderos domiciliarios irregulares, para consumo interno y el acceso de los canes a las vísceras generadas (Larrieu and Zanini, 2012). Actualmente, en la región, se mantienen programas de control en Uruguay, Chile y algunas provincias de Argentina. Estos programas han logrado disminuir las tasas de infección en perros seguido de una caída de la prevalencia en ganado y humanos, pero no se pueden considerar exitosos. Algunos problemas en dichos programas incluyen, la dependencia de la dosificación de los perros por parte de sus dueños, el uso de purgantes en lugar de drogas cestodidas, poco personal, información insuficiente sobre la tasa de infección en perros, falta de recolección de datos de ganado y perros que permitan evaluar el progreso del programa, problemas a nivel político, mal estado de la caminería, comunicación insuficiente, entre otros (Craig et al., 2007).

Dada la situación de los países de la región expuesta anteriormente, se plantea la necesidad de contar con una instancia de comunicación, cooperación y coordinación de actividades, por lo cual se crea en el año 2001, el Proyecto Sub-regional Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis: Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, con apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). En la primera reunión constitutiva, llevada a cabo en el año 2004, se establece la necesidad de crear una guía de estrategias homólogas para la subregión, con el fin de consolidar y extender la

cobertura de los programas de control existentes; promover la creación de programas de control en áreas endémicas sin cobertura y coordinar acciones en las áreas fronterizas (Irabedra and Salvatella, 2010). Dentro de las acciones a llevar adelante, figura el desarrollo de herramientas de laboratorio que permitan la caracterización de áreas endémicas y la puesta en marcha de actividades de control.

El perro sigue siendo un componente central para cortar el ciclo de transmisión, debido a lo cual, la prevalencia de la infección canina es uno de los mejores indicadores de la efectividad de la desparasitación y progreso de los programas de control. Resulta claro que el diagnóstico canino de la equinococosis es un elemento básico de los programas de control, ya que permite conocer la dinámica de la enfermedad, los índices de infección, definir zonas de riesgo, evaluar las medidas aplicadas y llevar a cabo acciones correctivas en caso de ser necesario (Torgerson and Deplazes, 2009). Adicionalmente, la herramienta diagnóstica más adecuada para este propósito, por los parámetros de sensibilidad y especificidad que exhibe en relación a otros métodos, así como por su costo y practicidad, es la detección de antígenos del parásito en la materia fecal del perro, mediante la técnica de coproELISA. La falta de disponibilidad de test comerciales o aún de ensayos de desarrollo propio que pudieran incorporarse a los programas de control regionales ha sido la base para el desarrollo de esta tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de diagnóstico de la equinocosis canina, económicamente sustentable, como soporte para las campañas de vigilancia y control de la hidatidosis que se llevan a cabo en la región.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conducir infecciones experimentales en perros, a fin de obtener muestras fecales y preparar material parasitario en condiciones controladas.
2. Producir un panel de anticuerpos poli y monoclonales que permitan el desarrollo de un ensayo “sándwich” de ELISA para la detección de antígenos de *Echinococcus granulosus* en heces de perros.
3. Seleccionar las combinaciones de anticuerpos que permitan la detección de antígenos en heces obtenidas de perros con baja carga, y que tengan el mínimo posible de reactividad cruzada con especies relacionadas.
4. Desarrollar estudios de campo para establecer los parámetros de sensibilidad y especificidad con muestras reales.
5. Llevar adelante estudios de estabilización de los distintos reactivos que permitan darle al ensayo un formato kit, con reactivos prontos para usar.
6. Implementar un formato rápido del ensayo, para facilitar el diagnóstico a campo en pocos minutos.

METODOLOGÍA

Declaraciones éticas

Todas las actividades que involucraron animales fueron llevadas a cabo cumpliendo los estándares de bioseguridad y asegurando el bienestar animal. Todos los protocolos se elaboraron de acuerdo a las pautas de *“The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”* (CIOMS, <http://www.cioms.ch/>), y fueron aprobados por los técnicos de la Comisión Nacional de Zoonosis y el Departamento de Investigación del Ministerio de Salud de la provincia de Chubut, Argentina.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PERROS

Diecinueve perros, de distintas razas y sexo, de tamaño mediano y de edad media, se mantuvieron en cautiverio en caniles cerrados, al aire libre, provistos con una zona de resguardo. Fueron alimentados con ración comercial y agua *ad libitum*. Previo a la infección, se vacunaron contra distemper canino (“joven edad”), parvovirus, rabia, leptospirosis, hepatitis y coronavirus (Merial, Francia). Se trataron por vía oral con praziquantel 5 mg/kg, pirantel embonato 15 mg/kg y febantel 15 mg/kg (Disper, Uruguay) para eliminar parásitos y tópicamente con solución de fipronil (Merial, Francia) para inhibir el desarrollo de parásitos ectópicos. A las hembras se les administró metoprene (Merial, Francia) para lograr inhibición del celo. Dos días después de la desparasitación, se recolectaron muestras fecales de los diecinueve perros (ver recolección y preparación de muestras más adelante), denominadas N1 a N19, las cuales fueron utilizadas como controles negativos durante todo el experimento.

Diez perros, nombrados P1 a P10, fueron infectados por vía oral con una carga variable entre 5.000 a 150.000 protoesclóides viables (más del 80% de viabilidad), provenientes de quistes hidáticos ovinos. El lavado, conteo y estudio de la viabilidad de los

protoescólices fueron realizados según lo descrito por (Smyth and Davies, 1974). Brevemente, el líquido hidático de los quistes se recolectó en copas de decantación, los protoescólices viables sedimentan rápidamente, mientras que los muertos flotan. De esta manera se recuperó el sedimento y se lavó varias veces con buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente se tiñeron con un colorante vital (azul de metileno) y se observaron en microscopio óptico para calcular el porcentaje de viabilidad (los protoescólices vivos no se tiñen). Según la publicación citada, se estima que 100 μ L de sedimento sin centrifugar, contienen aproximadamente 10.000 protoescólices. Dos perros adicionales, identificados como Th1 y Th2, fueron infectados por vía oral con 1 y 3 larvas de *T. hydatigena*, respectivamente. El material parasitario para ambas infecciones fue obtenido de frigoríficos del departamento de Paysandú. Los 7 perros restantes sólo fueron utilizados para obtener muestras negativas, por lo cual, después de la obtención fueron donados a personas interesadas o a protectoras de animales. Luego de la infección, se recolectaron materias fecales diariamente, de cada perro, desde el día cero de la infección hasta el día de la necropsia (P1 a P10) o hasta el día de la purgación (Th1 y 2).

Dentro de los 26 - 30 dpi, los perros infectados con *E. granulosus* fueron eutanasiados para realizar necropsia diagnóstica. Al realizar la necropsia a esa altura de la infección, se aseguró que no existiera aún liberación de huevos al medio ambiente (período prepatente), eliminando de esta manera cualquier riesgo biológico para otros animales, para el ambiente y para los técnicos que manejaron dichos perros. La eutanasia de los perros P1 - P10 se llevó a cabo utilizando una inyección intramuscular de acepromazina maleato (0,11 mg/kg) y ketamina (20 mg/kg) (Laboratorio Holliday, Argentina); seguido por una sobredosis de tiopental sódico por vía intravenosa (Laboratorio Crusur Vet, Uruguay). Los dos perros infectados con *T. hydatigena* fueron purgados a los 72 dpi con bromhidrato de arecolina (Crescent Chemical Co. Inc., USA), y los ejemplares de *T. hydatigena* recogidos fueron lavados y almacenados en PBS estéril; el resto del material defecado fue analizado para descartar la presencia de otros parásitos. Una vez finalizado el proceso, los animales se trataron con drogas antiparasitarias y fueron donados a personas interesadas.

Tres muestras adicionales de perros con *E. granulosus* (26 dpi) (P10 - P12) y dos con *T. hydatigena* (alrededor del 55 dpi) (Th 3 y 4), de estudios anteriores, fueron gentilmente cedidas por el Dr. Carmona (Casaravilla et al., 2005; Malgor et al., 1997).

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fecales fueron recolectadas diariamente durante la infección experimental y de la ampolla rectal en el caso de las necropsias diagnósticas de perros de campo (ver más adelante). Las muestras se colocaron en PBS – 1% de formaldehído 40%, con una relación volumen/volumen de 1:4 (materia fecal del tamaño de una nuez en 25 mL de solución, aproximadamente). Los frascos rotulados se hirvieron en baño maría durante 20 minutos para eliminar el riesgo biológico de la muestra. Se mezclaron vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea, y 10 mL de esta suspensión se centrifugaron a 2.200 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron en freezer a -20°C hasta ser procesados.

RECOLECCIÓN DE ADULTOS DE *Echinococcus granulosus* Y *Taenia hydatigena*

Para recolectar los parásitos, inicialmente se removió el intestino delgado, pinzando ambos extremos del mismo, se abrió longitudinalmente y se cortó en tres partes. Cada una de ellas fue colocada en recipientes con PBS estéril, que se colocaron en agitación moderada, a 37°C por 30 minutos. El sobrenadante se recolectó en copas de decantación y el sedimento se colocó en placas de petri grandes. Este material fue analizado con la ayuda de lupas, procediéndose a separar los parásitos del resto del material en suspensión. Los cestodos aislados se transfirieron a placas limpias conteniendo solución salina balanceada de Hank's estéril (Sigma, USA). En cámara de flujo horizontal se lavaron con medio RPMI o Medium 199 (Sigma) suplementado con glucosa (4 g/L), Penicilina (10^5 UI/L), Estreptomicina (100 mg/L) y Anfotericina B (250

µg/L) (Sigma, USA). Se cultivaron en botellas, a razón de 1.000 parásitos cada 10 mL de medio de cultivo, en estufa a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Cada 4 a 8 horas se recolectó el sobrenadante del cultivo, se guardó a -20°C y se repuso con medio fresco, mientras los gusanos se mantuvieron vivos y en buen estado. Finalmente, los parásitos se lavaron y guardaron en PBS estéril a -20°C (Casaravilla et al., 2005).

Los ejemplares de *T. hydatigena* recuperados mediante purgación de los perros infectados con bromhidrato de arecolina, se lavaron ampliamente, de la misma manera descrita para *E. granulosus*, y se cultivaron colocando, en este caso, un parásito en 50 mL de medio de cultivo. El sobrenadante se recolectó de igual forma que se hizo con *E. granulosus*.

PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS

El sobrenadante recolectado del cultivo de *E. granulosus* adulto se concentró aproximadamente 200 veces, utilizando una unidad de ultrafiltración Amicon con una membrana YM-10 (Millipore, USA), seguido de una diálisis contra PBS. De esta manera se produjo el antígeno de excreción/secreción (E/S) de *E. granulosus* (**EgE/S**). El antígeno somático de *E. granulosus* (**EgSm**) se preparó homogeneizando los parásitos recolectados del cultivo en un pequeño mortero (Potter-Elvehjem, Sigma, Alemania), en PBS suplementado con inhibidor de proteasas (Roche, USA), en hielo. Posteriormente este homogeneizado fue sonificado en OmniRuptor 4000 (Omni International Inc., USA), siguiendo diez ciclos de 10 segundos de sonificado/50 segundos de descanso. A continuación la preparación se centrifugó durante 20 minutos, se recolectó el sobrenadante, se filtró (0,22 µm) y finalmente fue almacenado a -20°C. El antígeno somático de *T. hydatigena* fue preparado de manera similar, utilizando distintas parte de un ejemplar adulto, y se denominó **ThSm**. Se determinó la concentración de proteínas de cada antígeno por el método del ácido bicinónico (BCA) (Pierce, USA) usando seroalbúmina bovina como referencia, y se estudió el perfil proteico mediante SDS-PAGE.

Además de estos antígenos, se contó con una valiosa colección de preparaciones antigénicas de distintos platelmintos, que fueron cedidos gentilmente por la Dra. Cecilia Casaravilla (Casaravilla et al., 2003). Estos incluyeron: antígenos de tegumento de *E. granulosus* (EgT); E/S y Sm de *T. hydatigena* (ThE/S y ThSm) así como E/S del estadio larval de *T. hydatigena* (ThE/SCt); de E/S y Sm de *Fasciola hepatica* (FhE/S y FhSm); Sm y E/S de *Dipylidium caninum* (DcSm y DcE/S); E/S de *Toxocara canis* (TcE/S); y Sm y E/S de *Mesocostoides corti* (McSm y McE/S). La concentración de cada uno de ellos fue determinada también mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, USA).

SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Los antígenos preparados de *E. granulosus* y *T. hydatigena* fueron separados por SDS-PAGE, en gel 12%, en condiciones reductoras, teñidos con Coomassie para visualizar el patrón de bandas o transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, USA) para posterior análisis mediante Western blot. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS con 5% de leche en polvo descremada (PBS-L), a 37°C durante 1 hora, y posteriormente se incubó a 37°C, 1 hora, con una dilución 1:100 de distintos sueros de conejo hiperinmune en PBS – 0,05% Tween 20 (PBS-T), o directamente con sobrenadante de cultivo de los distintos AcMos. La membrana fue entonces incubada durante 1 hora a 37°C con anticuerpos anti IgG de conejo o anti IgG de ratón, respectivamente, conjugados a fosfatasa alcalina (Pierce, USA), diluidos 1:2.500 en PBS – 0,5% seroalbúmina bovina (BSA). Se lavaron exhaustivamente y se reveló la reacción adicionando una solución sustrato con BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine salt) y NBT (Nitro.Blue Tetrazolium Chloride) preparada según instrucciones del fabricante (Sigma, USA).

La eventual naturaleza glucídica de los epitopes se estudió mediante tratamiento con periodato de sodio. Para ello, la membrana de nitrocelulosa, después de ser bloqueada con PBS-L, se lavó 3 veces con buffer acetato 50 mM, pH 4,5. Posteriormente se incubó con periodato de sodio 20 mM en buffer acetato durante 1 hora, a temperatura

ambiente, protegiendo de la luz. A continuación se incubó con borohidruro de sodio 50 mM en PBS, 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavó con PBS-T y PBS, se bloqueó nuevamente con PBS-L 1 hora a 37°C. Esta membrana así tratada se incubó con los diferentes anticuerpos y se realizó el inmunoblot siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Para preparar los anticuerpos policlones, 100 µg de antígenos EgE/S o EgSm se disolvieron en 250 µL de PBS y se mezclaron vigorosamente con 250 µL de adyuvante completo de Freund (ACF) (Pierce, USA), hasta obtener una solución homogénea. Esta emulsión se utilizó para inmunizar por primera vez (*priming*) conejos New Zealand de 2,5 a 3,0 kg, de 10 a 16 semanas, obtenidos del campo experimental del Instituto de Higiene. La emulsión se inyectó en el lomo del conejo, distribuida en 10 punciones intradérmicas de 50 µL cada una, para la inmunización inicial. A las 4 semanas se realizó un *booster* intramuscular con igual cantidad de antígeno en adyuvante incompleto de Freund (Pierce, USA) (200 µL/sitio, en 4 sitios), y se repitió cada 4 semanas, 1 o 2 veces más, hasta alcanzar un título de anticuerpos adecuado. Los sangrados para controlar la producción de anticuerpos (3 mL) se realizaron a través de la vena marginal de la oreja, y en los casos en que los anticuerpos presentaron buena reactividad con los antígenos EgE/S y EgSm, se procedió a realizar un sangrado final por punción intracardiaca, previa anestesia con Xilasina (10 mg/kg) y Ketamina (50 mg/kg) (Laboratorio Holliday, Argentina), hasta la muerte del animal por pérdida de volemia. Para preparar la fracción IgG de los sueros policlones, el suero de conejo se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio (Carlo Erba, Italia) (45:55 v/v), y las IgGs de la fracción precipitada se purificaron por afinidad con columnas de proteína G (Amersham, Suiza) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los hibridomas se generaron siguiendo el protocolo existente en la Cátedra de Inmunología desde hace muchos años (Gonzalez et al., 1994). Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intraperitoneal con 40 µg de uno de los antígenos (EgE/S o EgSm) con adyuvante completo de Freund, seguido de un *booster* a las 3 semanas, con igual cantidad de antígeno en adyuvante incompleto de Freund, y se repitió cada 3 semanas, 1 o 2 veces más, hasta alcanzar un título de anticuerpos adecuado. Se realizó una última inmunización 3 días antes de la fusión, a continuación los animales se sacrificaron para extraer el bazo. Los esplenocitos productores de anticuerpos se fusionaron con la línea de mieloma SP2/0 utilizando polietilenglicol 50%. Los hibridomas se cultivaron en placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca), con medio RPMI (Sigma, USA) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, USA) y 50 mg/L de gentamicina (BioBasic Inc, Canadá) y 10^6 timocitos/mL. Al día siguiente, se complementó el medio de cultivo con HAT 1:50 (Sigma, USA). A los 10 días de la fusión, se realizaron diferentes pruebas de ELISA para estudiar la reactividad de los AcMos. Los clones de interés fueron subclonados por dilución límite. Las células se contaron en cámara de Neubauer (Bright-Line, USA) y se diluyeron para obtener una solución que contuviera 10 células/µL en RPMI, HAT, 10% SFB, 50 mg/mL gentamicina y 10^6 timocitos/mL. Luego se realizaron diluciones seriadas para obtener 5, 2, 1 y 0,5 células/µL. Se mantuvieron sin mover durante 4 días, en estufa a 37°C con 5% de CO₂ y a partir de ese momento se comenzaron a observar en microscopio invertido, para determinar qué pocillos contenían un solo clon. Se testearon nuevamente estos clones aislados y los que mantenían el perfil de reactividad deseado se expandieron.

MONTAJE Y OPTIMIZACIÓN DEL coproELISA

Un coproELISA “sándwich” fue montado como se esquematiza en la **FIGURA 6** : placas de 96 pocillos de poliestireno (Greiner, Alemania) se sensibilizaron con 5 µg/mL de AcPo (CGB10 o C4 para coproELISA CPR39 o Eg9, respectivamente), dispensando 100

μL/pocillo. Se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente fueron bloqueadas con 200 μL/pocillo de PBS con 5% leche en polvo descremada (Conaprole, Uruguay), durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron 4 veces con PBS con 0,05% Tween 20 (PBS-T). En cada placa se colocaron: un blanco, controles positivo y negativo, y un calibrador (ver más adelante). Las muestras fueron analizadas por triplicado, previa dilución 1:2 en PBS, colocando 100 μL/pocillo. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se lavaron de la misma manera explicada anteriormente y se agregó el AcMo diluido 1:50 en PBS-T, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Se lavaron nuevamente y después se adicionaron 100 μL/pocillo de conjugado (anticuerpos de conejo anti IgG de ratón marcados con peroxidasa) (Pierce, USA), diluido 1:5.000 en PBS, 0,5% BSA y se pusieron a incubar otra hora a temperatura ambiente, con agitación. Finalmente, se lavaron las placas 6 veces y la reacción se relevó agregando 100 μL/pocillo de solución sustrato, preparada de la siguiente manera: 400 μL de TMB (6 mg/mL de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina en dimetilsulfóxido) (Sigma, USA), 100 μL de H₂O₂ 1% en agua destilada, en 25 mL de buffer acetato 0,1M pH 5,5). Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz y en agitación. La reacción fue frenada con 50 μL/pocillo de H₂SO₄ 2M y el color desarrollado se leyó a 450 - 620 nm en un lector de microplacas (Multiskan MS, Labsystems).

El calibrador consiste en una dilución del antígeno EgSm, que genera una lectura de densidad óptica equivalente al valor del cut-off. Los valores de absorbancia que se encuentran por encima del valor promedio del calibrador se consideraran positivos y los que presentan valores menores negativos. Valores de absorbancia entre ± 10% del valor cut-off se definieron como indeterminados, y deben repetirse. El valor cut-off se estableció mediante análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software de IBM SPSS Statistics 20.0 (USA) (Hanley and McNeil, 1982; McNeil and Hanley, 1984).

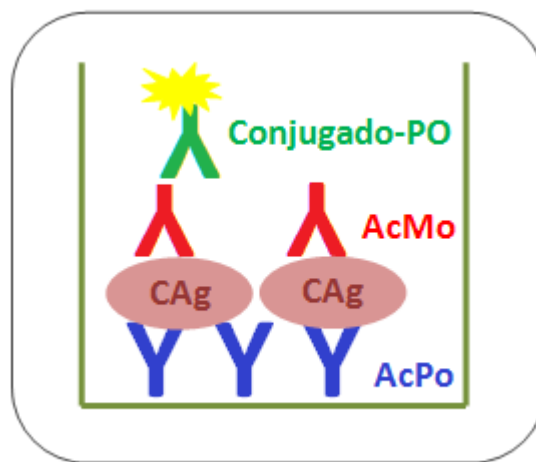


FIGURA 6. Esquema del coproELISA. Los anticuerpos policlonales (AcPo) anti-coproantígenos de *E. granulosus*, adsorbidos en el pocillo de la placa de ELISA, se utilizaron para capturar los antígenos del parásito (CAg) presentes en la materia fecal, los cuales luego fueron detectados con el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-coproantígeno. La señal se genera con un segundo anticuerpo, anti IgG de ratón, conjugado a peroxidasa.

MUESTRAS DE CAMPO

Con el fin de validar el ensayo a nivel regional, se procesaron también muestras de perros de campo, a los que se les hizo necropsia diagnóstica siguiendo el procedimiento indicado más arriba. Se obtuvieron 85 materias fecales de Chubut, Argentina, de perros entregados voluntariamente por sus dueños; y de manera similar, 11 muestras adicionales de Junín, Perú. Una vez necropsiados, se analizó minuciosamente el intestino delgado y la primera porción del intestino grueso (para búsqueda de *Trichuris vulpis*), detallando qué parásitos se encontraron y en qué número. Se tomaron muestras de materia fecal de la ampolla rectal para analizar por coproELISA. Estas muestras fueron de vital importancia para la validación del ensayo con muestras “reales”, que pueden presentar infecciones con múltiples parásitos.

Purificación del AcMo Eg9. Medio litro de sobrenadante se precipitó con igual volumen de una solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado y se incubó toda la noche a 4°C. La suspensión se centrifugó a 8.000 x g durante 30 min, y el pellet se resuspendió en 50 mL de buffer fosfato 20 mM pH 7,3. Esta muestra se aplicó a una columna Resource S (Pharmacia Biotech, Suecia) equilibrada en el buffer mencionado anteriormente y operada en el equipo AKTA Purifier (GE Healthcare Bio-sciences, Suecia). La columna se lavó con el mismo buffer (10 mL) y el AcMo Eg9 se eluyó con buffer fosfato 20 mM, 0,5 M NaCl, pH 7,3 y se dializó contra buffer 5 mM bórico pH 8,8.

Conjugación con carbón coloidal. 20 mg de Carbon Black 4 (Degusa AG, Alemania) se suspendieron en 10 ml de buffer 5 mM bórico pH 8,8. A 380 µg de anticuerpo (contenidos en un volumen entre 20 – 200 µL del mismo buffer) se le adicionó la suspensión de carbón al 0,2%, hasta un volumen final de 1 mL. La suspensión se sonicó en baño de ultrasonido (SB-120 DTN, Scientz, China) durante 1 minuto con descanso de 1 minuto, dos veces. Se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente se colocó a 4°C toda la noche. Se centrifugó 15 minutos a 14.000 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer de corrida (RB), 100 mM bórico, 1% BSA y 0,05% Tween 20, a fin de bloquear las partículas de carbón que permanecieron sin unir, se sonicó como se describió anteriormente, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 2 o 3 veces más para lavar el anticuerpo libre. Finalmente, el AcMo conjugado (Eg9-C), se diluyó en 1 mL de buffer RB con 0,05% de azida de sodio y se conservó a -20°C (Lonnberg, 2002; van Dam et al., 2004).

Sensibilización de tiras de nitrocelulosa. La línea de reacción con el AcPo C4 (0,5 mg/mL) y la línea de control con el anticuerpo anti-IgG de ratón (Thermo, USA) (0,5 mg/mL) se imprimieron sobre membrana de nitrocelulosa Hi-Flow Plus 120 (Millipore, USA) a 0,92 µg/cm, mediante el uso del equipo BioDot AD 1500 Liquid Dispenser (USA). Luego de secar a temperatura ambiente, se cortaron tiras de 5 mm, que se conservaron a temperatura ambiente en bolsas plásticas cerradas.

Ensayo de flujo lateral. En un pocillo de reacción se colocaron 10 μ L de la muestra a analizar (preparadas de la misma forma que para el coproELISA) junto con 10 μ L del conjugado AcMo Eg9-carbón (Eg9-C) (FIGURA 7), llevando a un volumen final de 100 μ L con buffer RB. Se sumergió entonces, la parte inferior de la tira, durante 15 minutos, permitiendo que el líquido migre por capilaridad a través de la membrana de nitrocelulosa y ocurra la reacción con los anticuerpos inmovilizados anteriormente la misma.

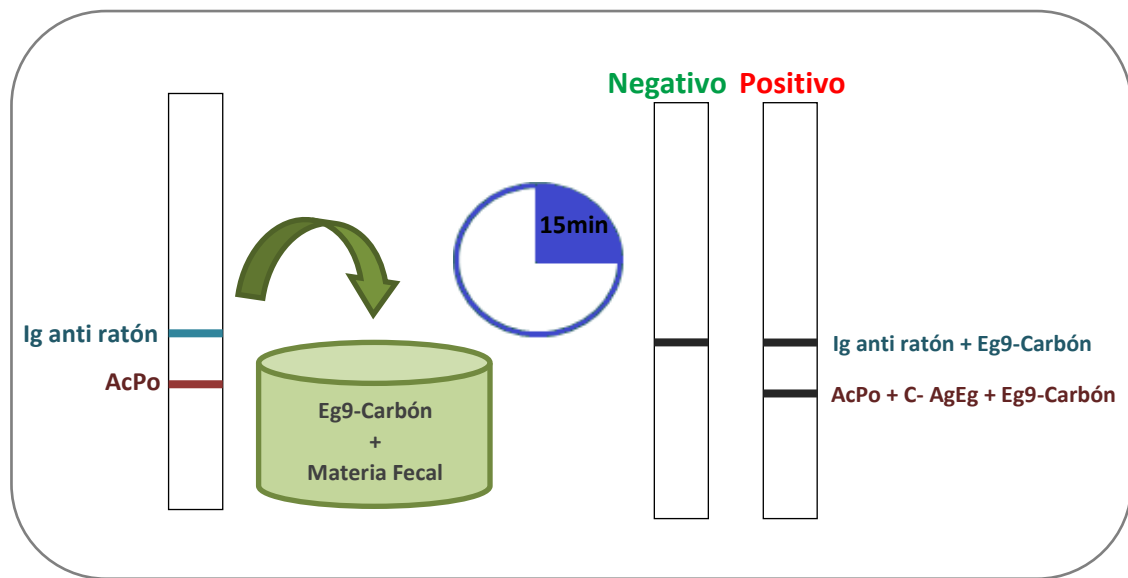


FIGURA 7. Esquema del formato rápido del ensayo. Ig anti ratón: anticuerpos anti ratón sin conjugar, AcPo: anticuerpo policlonal de captura, Eg9-C: AcMo Eg9 conjugado a partículas de carbón coloidal, C-AgEg: coproantígenos de *E. granulosus*.

RESULTADOS

INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PERROS

En el análisis de las necropsias de los perros infectados experimentalmente, se encontraron *E. granulosus* en nueve de los diez perros infectados (P1-P9). La carga parasitaria diagnosticada en cada perro varió en un rango que iba desde 74 hasta 8.500 parásitos (TABLA 2). No se encontró correlación entre la cantidad de protoescolices utilizada para la infección y la carga final de parásitos. Además se observaron parásitos de tamaños muy diferentes, a pesar de tener el mismo tiempo de infección. No se observaron parásitos adicionales en ninguno de los perros.

Identificación	Sexo	Tamaño	Carga PE	Necropsia	Carga Eg
P1	Hembra	Mediano	150.000	27 dpi	1.000
P2	Hembra	Mediano	150.000	28 dpi	8.500
P3	Hembra	Chico	150.000	28 dpi	200
P4	Macho	Chico	100.000	30 dpi	3.500
P5	Hembra	Mediano	5.000	26 dpi	200
P6	Macho	Grande	50.000	27 dpi	168
P7	Hembra	Grande	30.000	27 dpi	128
P8	Macho	Chico	20.000	28 dpi	3.459
P9	Macho	Grande	20.000	28 dpi	74

TABLA 2. Resultados de la infección experimental. Se detallan sexo y tamaño de cada perro, la carga de protoescolices (PE) utilizada para la infección, los días post infección (dpi) a los que se realizó la necropsia y la carga de *E. granulosus* (Eg) encontrada.

De las purgaciones con arecolina, realizadas a los perros infectados con *T. hydatigena* (Th1 y Th2), ambos hembras y grandes, se recolectaron 1 y 2 ejemplares,

respectivamente, de menos de un metro de largo. No se observó ningún otro parásito en el análisis del material expulsado.

Además se contó con muestras cedidas por el Dr. Carmona, P10 – P12, que contenían 61, 47 y 120 parásitos, respectivamente y correspondían al día 26 post infección. Por su parte, los dos perros Th3 y Th4 (con *T. hydatigena*), obtenidas alrededor del día 55 post infección, tenían 3 tenias el primero y del segundo no se conocía el número de parásitos.

CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS

Los antígenos EgE/S, EgSm y ThSm preparados como se indicó anteriormente, fueron estudiados mediante SDS-PAGE. Se incluyó sonicado de protoescolices (Px) como antígeno de referencia. Como se observa en la **FIGURA 8A**, todas las preparaciones mostraron una compleja composición, no revelándose en el perfil ninguna similitud obvia entre componentes individuales de los diferentes antígenos.

La reactividad de los anticuerpos policlonales contra estos antígenos se estudió por Western blot. En la **FIGURA 8B** se muestra el resultado obtenido con AcPo CGB10 preparado contra antígeno somático de *E. granulosus*; otros AcPo dieron lugar a resultados similares. Se produjo una fuerte reactividad contra numerosos componentes no solo del antígeno de inmunización, sino contra otras preparaciones del parásito. También se observó una importante reactividad cruzada con la preparación de *T. hydatigena*. El tratamiento con periodato de sodio disminuyó en cierta medida la reactividad contra EgSm, con mínimo efecto en el caso de EgE/S o ThSm. Esto resultó inesperado, dado que, en general, los trabajos previos sobre reactividad de coproantígenos reportan una inmunodominancia de los epitopes glucídicos de estos antígenos (Elayoubi and Craig, 2004; Elayoubi et al., 2003). Para descartar que nuestros resultados estuvieran afectados por un defecto en la técnica de modificación de los azúcares con periodato, la eficacia del tratamiento fue evaluada utilizando en paralelo el AcMo E492/G1 (Dematteis et al., 2001), el cual reacciona

específicamente contra epitopes glucídicos altamente expresados en preparado de protoescolices de *E. granulosus* (FIGURA 8C).

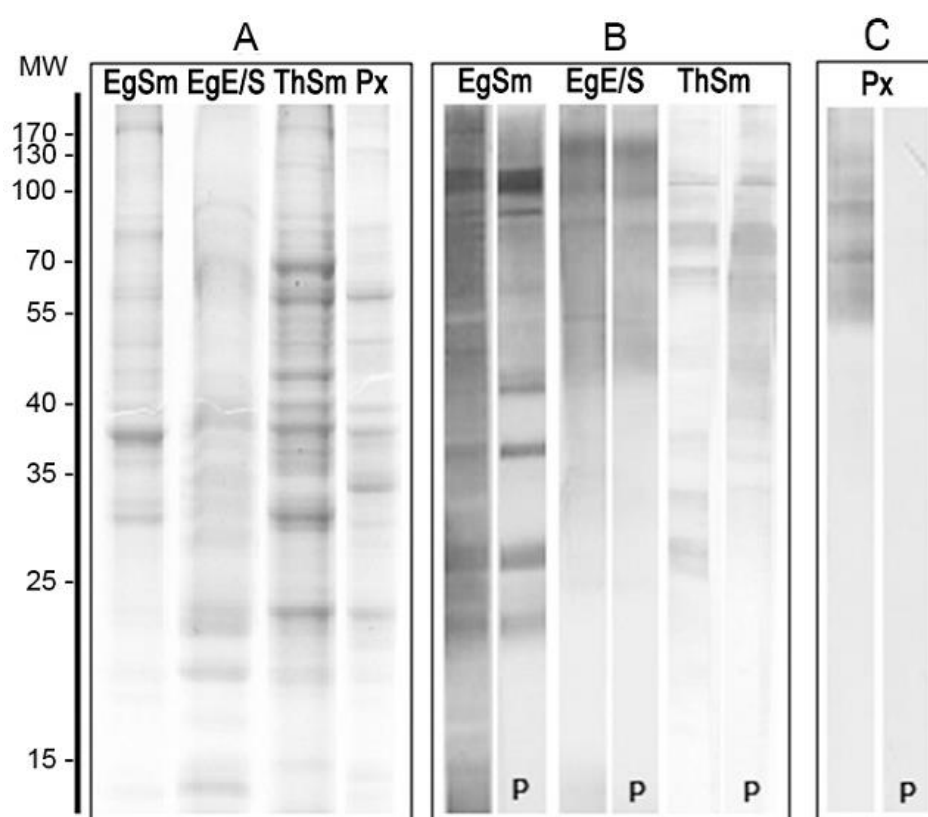


FIGURA 8. PAGE de antígenos parasitarios e inmunoblot con anticuerpo policlonal.

A) SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie, de antígenos de *E. granulosus*: E/S: antígeno de excreción/secreción, Sm: antígenos somático, Px: sonicado de protoescolices, y antígeno somático de *T. hydatigena*: ThSm. B) Inmunoblot con el AcPo CGB10. C) Inmunoblot control con el AcMo E492/G1, que reconoce un epitope glucídico sensible al tratamiento con periodato. Las tiras de nitrocelulosa señaladas con P fueron tratadas con periodato de sodio para modificar los epitopes glucídicos.

La marcada reactividad cruzada del AcPo frente a componentes de los antígenos ThSm, denota lo difícil que es la obtención de ensayos específicos utilizando para la captura y detección este tipo de anticuerpos, por lo que los esfuerzos siguientes se enfocaron en la producción y selección de anticuerpos monoclonales.

SELECCIÓN INICIAL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los AcMos se prepararon a partir de ratones inmunizados con EgSm, EgE/S, o inmunizaciones intercaladas con los mismos. La selección de los clones productores se realizó a través de distintas estrategias a lo largo del trabajo de Maestría. En todos los casos la selección inicial se realizó mediante ELISA en placas sensibilizadas con EgE/S o EgSm. En los primeros experimentos se utilizó un conjugado a peroxidasa anti IgM/IgG de ratón (Thermo Scientific, USA) para la selección. El análisis posterior de estos clones evidenció que, en su gran mayoría, los hibridomas seleccionados secretaban IgM, y muy pocos clones correspondían a IgG. Por esta razón, en subsiguientes fusiones se comenzó directamente seleccionando clones secretores de IgG, por considerarse un isotipo más adecuado para el desarrollo de inmunoensayos de alta sensibilidad.

Luego de esta selección primaria basada en la reactividad contra antígenos somáticos o de E/S, se realizaron selecciones adicionales en formato “sándwich”, estudiando la reactividad directamente contra coproantígenos. En estos ensayos se utilizó el AcPo CGB10 (obtenido por inmunización con EgSm) para la captura, muestras fecales de perros infectados experimentalmente como antígenos, y se estudió la reactividad de cada uno de los sobrenadantes de los hibridomas contra los inmuno-complejos así formados, usando un conjugado anti-IgG de ratón para la detección. De estas primeras fusiones se seleccionó un AcMo, que se denominó CPR39, por dar buena señal con la muestra positiva utilizada en el *screening* y por no reaccionar con la muestra negativa.

CoproELISA MONTADO CON EL AcMo CPR39

El primer coproELISA fue montado utilizando el AcMo CPR39. Como se mencionó, este AcMo, tipificado como IgG2b, fue seleccionado a partir de su reactividad contra los antígenos de E/S y Sm de *E. granulosus*, y posteriormente por su capacidad de discriminar muestras negativas de positivas. Cuando el anticuerpo CPR39 se probó en combinaciones con otros AcPo disponibles, para el análisis preliminar de un grupo de muestras positivas y negativas, el que brindó mejores resultados fue el AcPo CGB10

que se había usado en la selección original, por lo que el mismo se adoptó para el desarrollo del coproELISA CPR39. Con este ensayo se analizaron 19 muestras negativas, correspondientes al día 0 de la infección experimental, y muestras del último día de la infección (26 - 30 dpi) de los perros experimentalmente infectados (P1 - P12). Como se visualiza en la **FIGURA 9**, todas las muestras con *E. granulosus* fueron clasificadas como positivas por el ensayo, aún aquellas con baja carga de parásitos. Sin embargo, en el caso de éstas últimas, las lecturas de absorbancia obtenidas fueron muy cercanas al valor cut-off, calculado en esta etapa como el promedio de las muestras negativas + 3 desvíos estándar (DE).

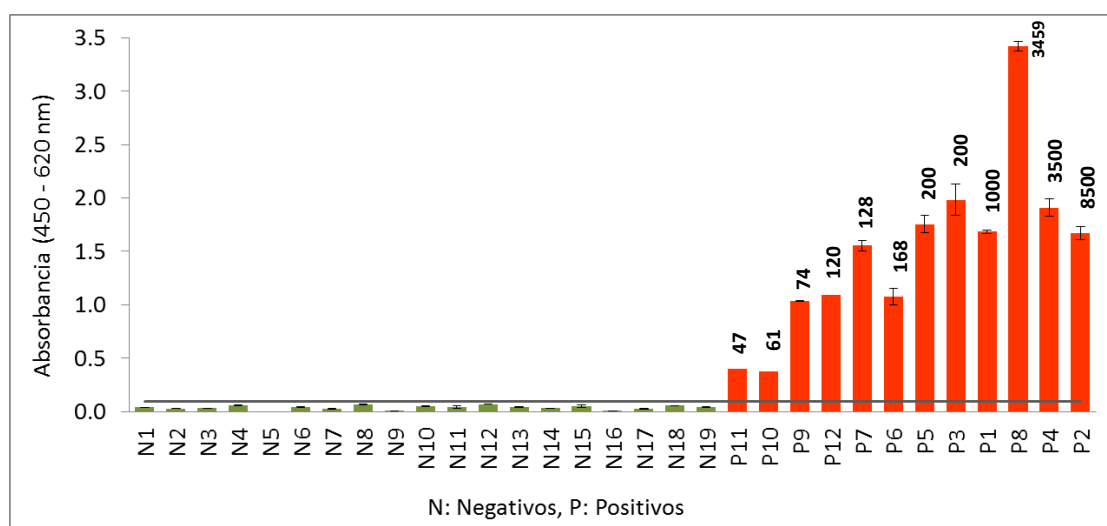


FIGURA 9. Análisis de muestras de perros experimentales con coproELISA montado con AcMo CPR39. Las barras verdes corresponden a perros negativos y las rojas a perros positivos para *E. granulosus*, ordenados de menor a mayor carga parasitaria (especificada encima de cada barra). La línea punteada representa el valor cut-off (promedio de muestras negativas + 3 desvíos estándar). Las barras de error corresponden al desvío estándar de cada muestra para n=3.

Adicionalmente, las materias fecales recolectadas desde el día 0 hasta el día de la necropsia, de cada perro infectado experimentalmente, fueron analizadas mediante el coproELISA CPR39 (**FIGURA 10**). Utilizando el valor de corte de 0,090 (ver forma de cálculo más arriba), se encontró que las muestras con más de 200 parásitos se volvían positivas alrededor de la segunda semana (11 – 14 dpi), y que, a pesar de presentar

algunas fluctuaciones, se mantienen positivas durante el resto de los días. Por otro lado, los canes con baja carga parasitaria (47 a 168 parásitos) comenzaron a ser positivos hacia el final del período de infección (después del día 20), presentando bajos valores de absorbancia a lo largo de todo el experimento. Se analizaron todas las materias recolectadas del perro que no contrajo la infección y resultaron todas negativas (no se muestra). Se analizaron también las materias de los perros infectados con *T. hydatigena*, encontrándose bajas lecturas a lo largo de la infección, con algunos resultados positivos aislados durante el curso de la misma, después del día 40 post infección (resultados no mostrados).

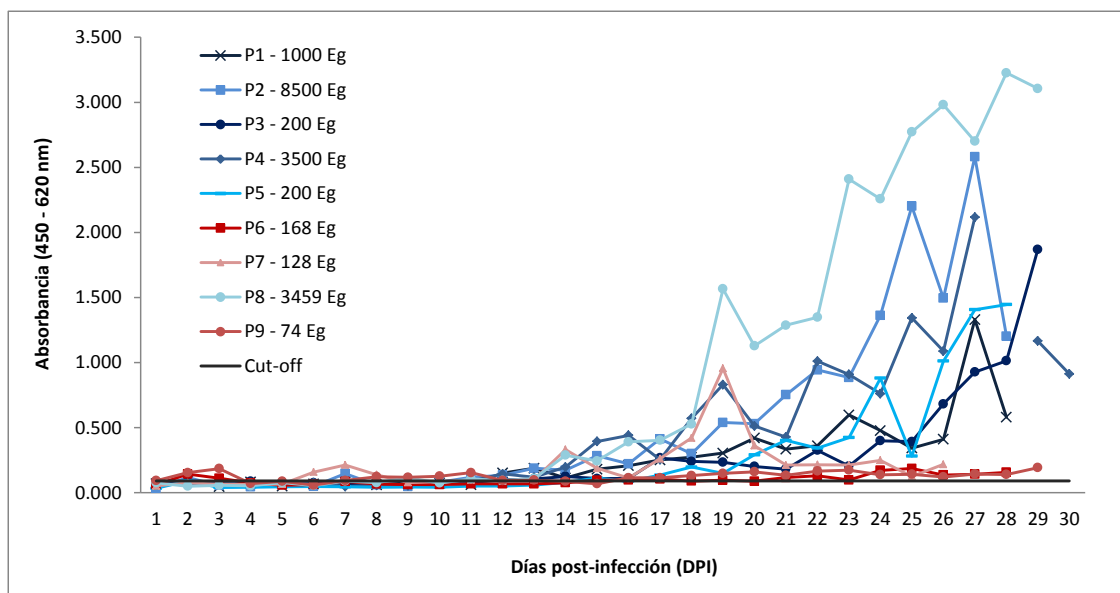


FIGURA 10. Excreción de coproantígenos durante el período de infección experimental, estudiada con coproELISA CPR39. En la leyenda se muestra la cantidad de parásitos de cada perro, los que tenían menos de 200 ejemplares se muestran en tonos rojos y los de carga igual o mayor a 200 en tonos de azul. La línea negra representa el valor de corte (0,090), calculado como se especificó anteriormente.

NUEVA SELECCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Si bien los resultados obtenidos con el AcMo CPR39 eran buenos, preocupaba el hecho de que las muestras con baja carga de parásitos presentaban lecturas de absorbancia

muy cercanas al valor cut-off, además de que se volvían positivas recién hacia el final de la infección. Por este motivo se decidió buscar una nueva estrategia de selección de clones productores de anticuerpos monoclonales que permitiera aumentar la sensibilidad.

Como se indicó anteriormente, en esta segunda etapa de fusiones, los sobrenadantes fueron inicialmente probados contra ambos antígenos de *E. granulosus*, seleccionando exclusivamente clones productores de IgG. Los 13 clones clones que presentaban altos valores de absorbancia contra los antígenos EgE/S y EgSm fueron enfrentados en formato “sándwich”, usando el AcPo CGB10 para la captura y las siguientes muestras como fuente de coproantígenos: i) una muestra negativa perteneciente a un perro no infectado, ii) una muestra positiva proveniente de un perro con baja carga parasitaria (P9, 28 dpi), iii) una muestra positiva de un perro con un número elevado de parásitos pero obtenida en días tempranos de la infección (P8, 10 dpi) y iv) una muestra de un perro con *T. hydatigena* (Th2) tomada a los 56 dpi (que resultó positiva en coproELISA con CPR39). La idea fue seleccionar aquellos clones capaces de identificar perros con *E. granulosus*, aún con baja carga, en el período prepatente y con escasa reactividad cruzada con especies relacionadas como *T. hydatigena*. De este complejo proceso de selección, que incluyó varios experimentos de fusiones y el *screening* de más de 1200 hibridomas se seleccionó un set de 12 clones que arrojaron los mejores resultados con las muestras (ii) y (iii) y bajos valores de absorbancia con las muestras (i) y (iv). Los mismos presentaban un perfil de reconocimiento muy similar en inmunoblots realizados contra EgSm, **FIGURA 11**, excepto por una banda adicional de aproximadamente 55 kDa para el clon denominado Eg9. Con los sobrenadantes de estos clones se montaron coproELISAs combinándolos con los AcPo disponibles, y se utilizó un conjunto de muestras de baja carga y muestras de perros infectados con *T. hydatigena* para seleccionar los que presentaban la mejor relación señal/ruido y menor reactividad cruzada. Los mejores resultados se obtuvieron con el AcMo Eg9 en coproELISA, en combinación con el anticuerpo policlonal denominado C4 que había sido preparado mediante inmunización con EgE/S. El AcMo Eg9 se obtuvo a partir de un ratón que había sido inmunizado en 4 oportunidades, en las que se alternó el uso de los antígenos EgE/S y EgSm.

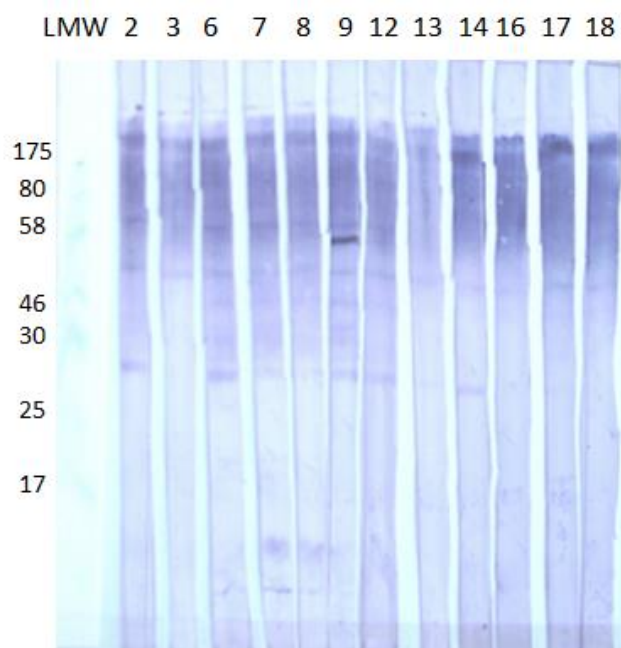


FIGURA 11. Inmunoblots con clones seleccionados con la nueva estrategia. Se muestra el patrón de reactividad similar observada contra EgSm, de 12 clones seleccionados por su positividad en ELISA contra los antígenos EgSm y EgE/S. Se evidenció una banda diferente en el clon 9 de alrededor de 55 kDa.

La reactividad del AcMo Eg9 contra los antígenos de *E. granulosus* y *T. hydatigena* se estudió por Western blot, **FIGURA 12B**. El anticuerpo reaccionó con un gran número de bandas de EgSm, mayormente de mediano y alto peso molecular. El hecho de que este anticuerpo reaccione con un número importante de componentes del parásito, sugiere que el epítopo puede corresponder a una modificación postraducciona. Basado en los antecedentes, (Elayoubi and Craig, 2004; Elayoubi et al., 2003), sería esperable que se tratase de un motivo de glicosilación. Sin embargo, y en forma similar a lo observado con el AcPo, el tratamiento con periodato no alteró la reactividad de Eg9 contra ninguno de los antígenos. Con respecto al antígeno EgE/S, se observaron dos componentes principales, de 100 y 160 kDa, que se encontraron presentes también en la preparación de EgSm, pero en menor concentración relativa. El componente de aproximadamente 55 kDa que aparecía con una inmunoreactividad muy marcada en el blot anterior (**FIGURA 11**) no resultó tan evidente, y solo se observó claramente en la preparación de EgSm. La reactividad cruzada contra el antígeno somático de *T.*

hydatigena resultó insignificante, así como contra el sonicado de protoescolices (no mostrado).

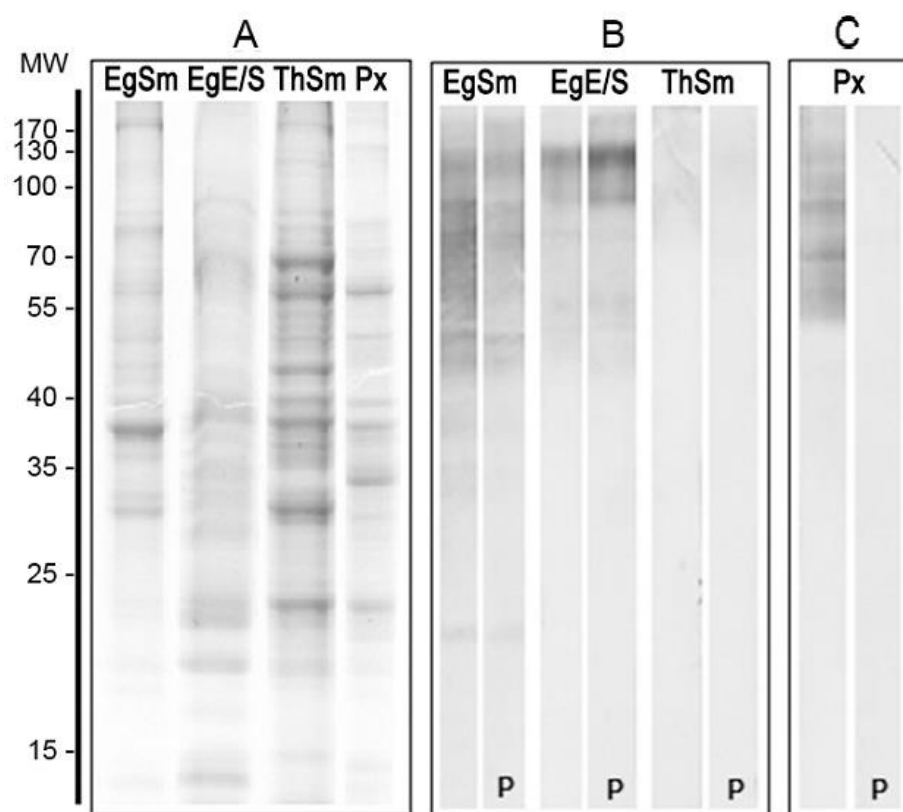


FIGURA 12. SDS-PAGE de antígenos parasitarios e inmunoblot del anticuerpo monoclonal Eg9. A) SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie, de antígenos de *E. granulosus*: E/S: antígeno de excreción/secreción, Sm: antígenos somático, Px: sonicado de protoescolices, y antígeno somático de *T. hydatigena*: ThSm. El marcador de peso molecular en kDa se muestra a la izquierda de la figura. B) Inmunoblot del AcMo Eg9. C) Inmunoblot del AcMo E492/G1. Las tiras de nitrocelulosa señaladas con P fueron tratadas con periodato de sodio para modificar los epitopes glucídicos.

CoproELISA MONTADO CON EL AcMo Eg9

Basados en los resultados obtenidos al caracterizar el AcMo Eg9, se pasó a montar un nuevo coproELISA, utilizando el AcPo C4 para la captura y este monoclonal para la detección, optimizándose distintos parámetros. Inicialmente se ajustó la concentración del AcPo C4, **FIGURA 13A**. Si bien los valores con la sensibilización con 2 µg/mL del AcPo en PBS fueron aceptables, se optó por utilizar 5 µg/mL por la buena relación

señal/ruido observada y por dar lugar a lecturas importantes aún para la muestra de baja carga P6. También se estudiaron distintos buffers para la sensibilización, y si bien no hubo grandes diferencias, la sensibilización usando PBS produjo el menor ruido de fondo y lecturas alta, **FIGURA 13B**. De los agentes bloqueantes ensayados, PBS - 1% BSA (PBS-BSA), PBS - 0,1% Tween 20 (PBS-T) y PBS - 5% leche el polvo descremada (PBS-L), **FIGURA 13C**, el bloqueo con PBS-T fue el menos efectivo, en tanto que las otras dos soluciones actuaron en forma similar, pero se optó por el PBS-L debido al menor costo de la leche en polvo en comparación con la BSA

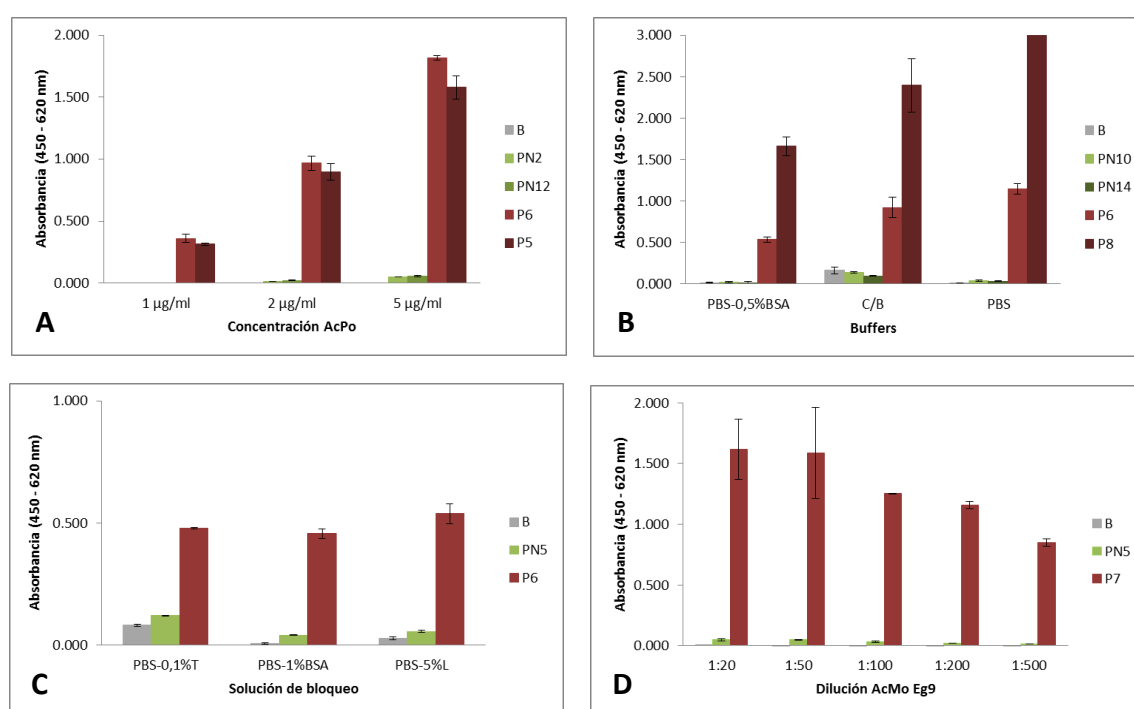


FIGURA 13. Optimización de distintos parámetros empleados en el ensayo. La concentración de anticuerpo AcPo C4 (A) y el buffer (B) utilizado en la sensibilización, el agente bloqueante (C), y la dilución de sobrenadante del clon Eg9 (D) se estudiaron en las condiciones mostradas, usando muestras de perros negativos (PN) o positivos (P), C/B, buffer bicarbonato 100 mm, pH 9,5; T, Tween 20; L, leche descremada.

Dado que no se hizo necesario purificar el AcMo Eg9, se estudió su desempeño en un rango de concentraciones, **FIGURA 13D**. No se observaron mayores diferencias en la relación señal/ruido entre las diluciones 1:20 y 1:50, mientras que a mayores diluciones la lectura disminuye, por lo que se adoptó esta última dilución para la optimización del ensayo. Ensayos similares se plantearon para definir la dilución

óptima del conjugado (anti-IgG de ratón preparado en conejo, Pierce, USA), resultando ser de 1:5.000 (resultados no mostrados).

Cuando el ensayo optimizado se empleó para analizar las muestras provenientes de perros experimentales, fue evidente que el mismo producía señales más elevadas que las obtenidas con el coproELISA CPR39, aún con muestras de perros con bajo número de parásitos, permitiendo una mejor discriminación de la infección, **FIGURA 14**. Esto se consideró una mejora muy importante dado que este tipo de muestras no son detectadas en la mayoría de los test reportados.

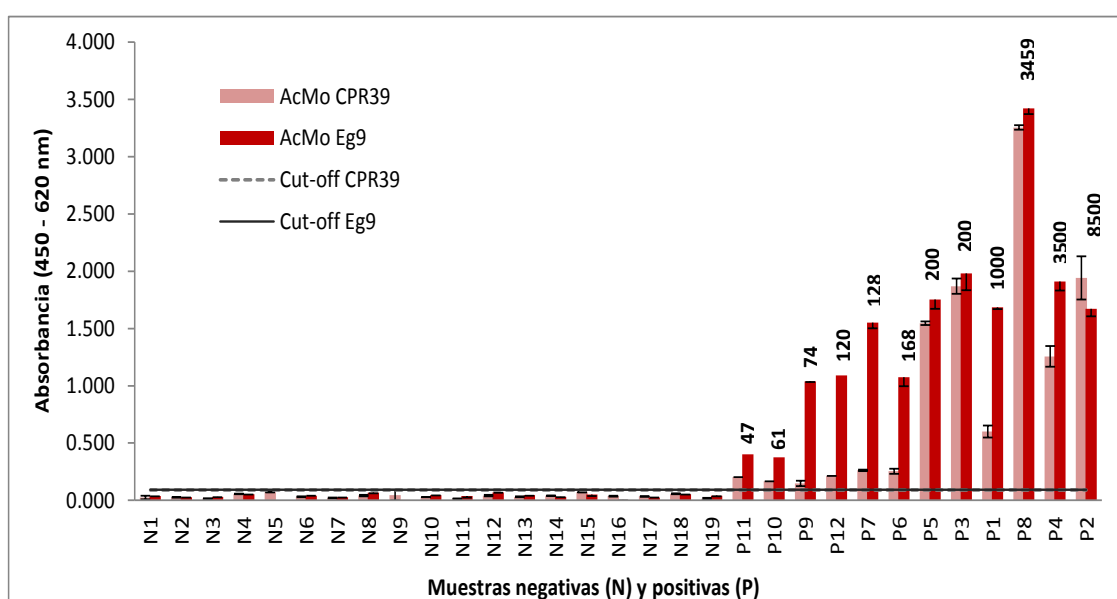


FIGURA 14. Análisis de muestras experimentales con el coproELISA Eg9 y comparación con los resultados obtenidos con coproELISA CPR39. Los perros positivos para *E. granulosus* se ordenaron de menor a mayor carga parasitaria (especificada encima de cada barra). Las líneas negras (punteada y entera) representan el valor cut-off de CPR39 y Eg9 respectivamente (ver cálculo arriba). Las barras de error corresponden al desvío estándar de cada muestra para n=3.

El nuevo test también permitió detectar perros positivos más tempranamente durante el curso de la infección, **FIGURA 15**. Usando un valor cut-off estimado como el promedio de negativos + 3 desviaciones estándares, los animales comenzaron a volverse positivos alrededor de los días 10 - 16 post-infección y a partir del día 16 los títulos comenzaron a elevarse en forma significativa, aún para los perros de baja carga.

Curiosamente, los perros P7 y P8 se pudieron detectar muy temprano, lo cual es remarcable sobre todo en el caso de P7, que al momento de la necropsia tenía un bajo número de parásitos (128) y es probable que se produjese por la expulsión espontánea de parásitos unos días después de la infección.

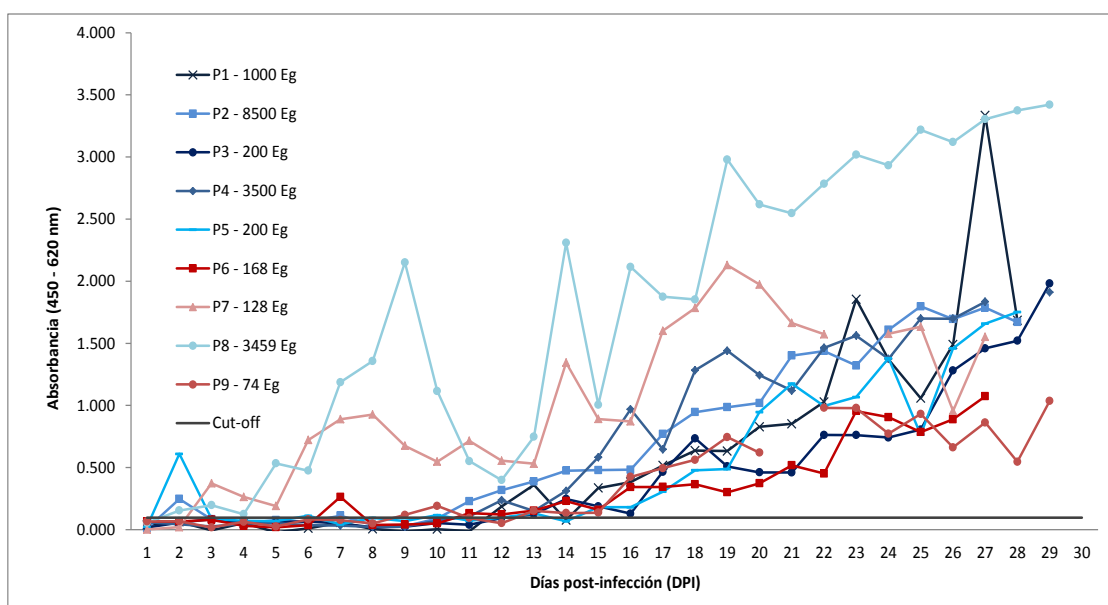


FIGURA 15. Excreción de coproantígenos durante el período de infección experimental, estudiada con coproELISA Eg9. En la leyenda se muestra la cantidad de parásitos de cada perro, los que tenían menos de 200 ejemplares se muestran en tonos rojos y los de carga igual o mayor a 200 en tonos de azul. La línea negra representa el valor de corte (0,096), calculado como se especificó más arriba.

En cuanto a la reactividad cruzada con antígenos de *T. hydatigena*, ésta fue un motivo de preocupación a lo largo de este trabajo, debido a la alta incidencia de esta parasitosis en la población canina, y a que la cercanía filogenética con este parásito permite anticipar un alto grado de similitud antigénica. Esta reactividad se estudió usando las muestras obtenidas en la infección experimental con este parásito, la cual se analizó en una ventana de tiempo mayor (70 días), teniendo en cuenta el mayor tiempo requerido por *T. hydatigena* para alcanzar la madurez sexual. En la **FIGURA 16** se exponen los resultados de las muestras disponibles; como se puede ver, a excepción de Th2, de la cual se recogieron muestras diarias, de los demás animales solo se contaba con materia fecal de algunos días. En general sólo en algunas ocasiones, y

después del día 40 post infección, se obtuvieron algunos resultados positivos, observándose además lecturas bajas en comparación con las obtenidas con los perros verdaderos positivos.

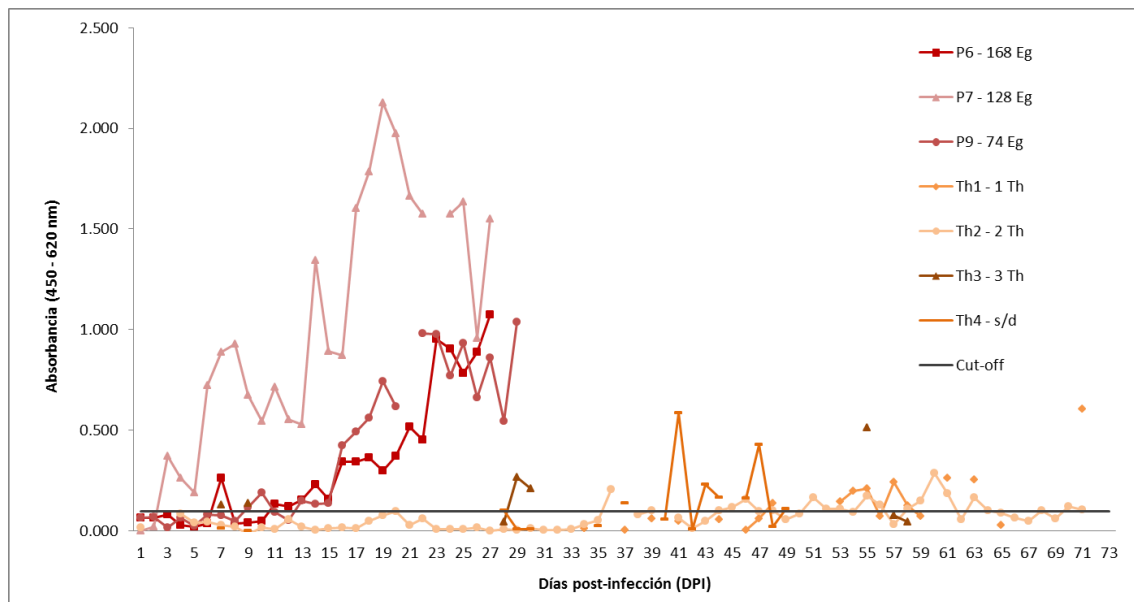


FIGURA 16. Excreción de coproantígenos en perros infectados experimentalmente con *T. hydatigena*, detectados mediante coproELISA Eg9. En la leyenda se indica la cantidad de parásitos recuperados de cada animal después de la purgación con arecolina, a excepción de Th4, del que no se tiene dicha información. Al igual que en la gráfica anterior se colocó el valor cut-off de 0,096 (línea negra). Se graficaron también 3 perros con *E. granulosus* (con bajo número de parásitos) para facilitar la comparación de los resultados obtenidos.

CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DEL ENSAYO

REACTIVIDAD DEL coproELISA Eg9 FRENTE A DISTINTOS ANTÍGENOS PARASITARIOS

Para profundizar la caracterización de la reactividad cruzada del ensayo el mismo se enfrentó a un panel de antígenos parasitarios derivados de platelmintos de importancia local (*E. granulosus* y *T. hydatigena*, *Fasciola hepatica*, *Dipylidium*

caninum, *Mesocestoides corti*, y *Toxocara canis*). Cada antígeno fue titulado a partir de 1 µg/mL (concentración proteica estimada por el método de BCA), lo cual permitió evaluar el grado de reactividad relativa a iguales concentraciones, y estimar la cantidad mínima de extracto detectada por el ensayo, **FIGURA 17**. El extracto que tuvo la mayor concentración de antígenos detectable por el ensayo fue la preparación de E/S de *E. granulosus*. Aún a la mayor dilución ensayada de este extracto (0,4 ng/mL) se observó una señal medible. Teniendo en cuenta que los componentes reactivos de esta preparación parecerían ser minoritarios, como surgió de la comparación del perfil de proteínas teñidas con Coomasie en relación a la reactividad en inmunoblot (**FIGURA 12**), el nivel de detección del ensayo, que estuvo muy por debajo de los ng/mL, sugirió la alta afinidad de los anticuerpos seleccionados. Curiosamente, los componentes inmunoreactivos estuvieron en muy baja concentración en la preparación de antígeno somático de *E. granulosus*, de hecho, el segundo extracto más reactivo resultó ser el preparado de E/S de *T. hydatigena*.

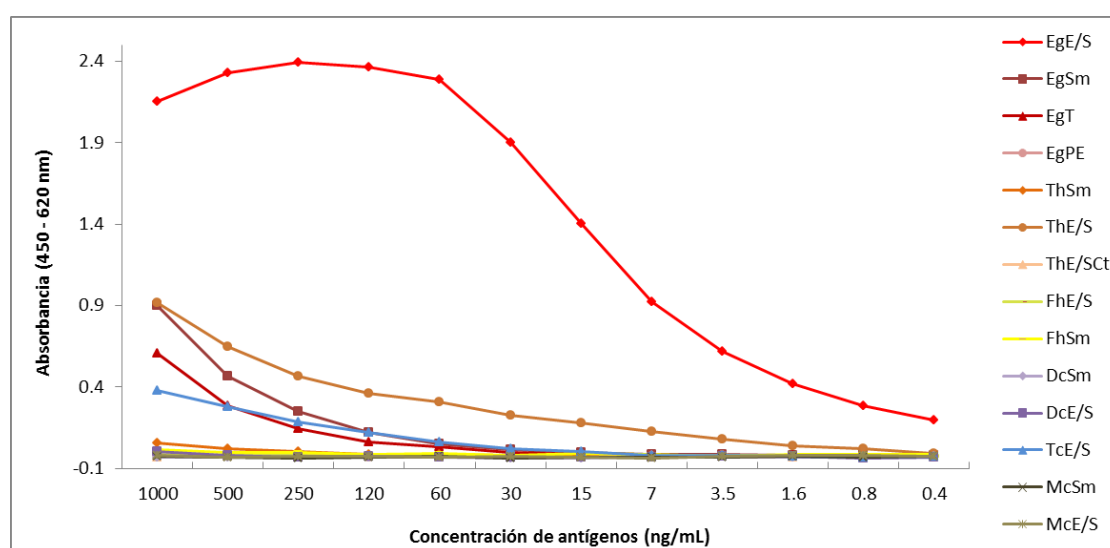


FIGURA 17. Titulación de diferentes antígenos parasitarios mediante coproELISA Eg9. Todos los antígenos fueron titulados a partir de 1 µg/mL. Las dos primeras letras indican el parásito del cual se preparó el antígeno: Eg, *E. granulosus*, Th, *T. hydatigena*; Fh, *Fasciola hepatica*; Dc, *Dipylidium caninum*; Tc, *Toxocara canis*; Mc, *Mesocestoides corti*. Las restantes letras refieren al origen: E/S, excreción/secreción del adulto; Sm: somático, T, tegumento; PE, protoescolices; E/SCT, excreción/secreción del estadio larval.

Más aún, los otros extractos que mostraron algún grado de reactividad fueron la preparación de tegumento de *E. granulosus*, y el antígeno de E/S de *Toxocara canis*. Los demás antígenos, incluyendo el antígeno somático de *T. hydatigena*, resultaron negativos. Este resultado indicaría que el ensayo detecta mayormente antígenos presentes en la excreción/secreción de *E. granulosus*, y que el origen de la reactividad cruzada con otros parásitos, que es claramente minoritaria, ocurría también en relación a productos de E/S de los mismos.

VALIDACIÓN DEL ENSAYO CON MUESTRAS DE CAMPO

El ensayo fue validado utilizando muestras de campo obtenidas de perros diagnosticados mediante necropsia. Se analizaron 96 animales, 85 en la provincia de Chubut, Argentina y 11 de la provincia de Junín, Perú.

Identificación	Sexo	Tamaño	Localidad	Resultado Necropsia
Ch2	Macho	Mediano	Sarmiento	Dc
Ch3	Macho	Mediano	Sarmiento	Neg
Ch4	Macho	Grande	Sarmiento	To, Dc
Ch5	Hembra	Chico	Comodoro	Neg
Ch6	Macho	Mediano	Trelew	To, Dc, Th, Tv
Ch7	Hembra	Mediano	Trelew	Neg
Ch8	Macho	Grande	Trelew	To
Ch9	Macho	Grande	Trelew	Tsp, Dc
Ch10	Hembra	Grande	Trelew	Neg
Ch11	Macho	Grande	Trelew	Dc
Ch13	Macho	Grande	Trelew	Dc
Ch14	Macho	Grande	Trelew	Neg
Ch15	Macho	Mediano	Trelew	Neg
Ch16	Macho	Grande	Trelew	Neg
Ch17	Hembra	Mediano	Trelew	Tv

Ch18	Hembra	Grande	Trelew	Dc
Ch19	Hembra	Mediano	Trelew	To
Ch20	Hembra	Chico	Trelew	To, Dc
Ch21	Hembra	Mediano	Trelew	Neg
Ch23	Macho	Mediano	Trelew	Eg, To
Ch24	Macho	Grande	Trelew	To
Ch25	Hembra	Grande	Trelew	To
Ch26	Hembra	Chico	Trelew	To
Ch27	Hembra	Chico	Trelew	To
Ch28	Hembra	Chico	Rawson	To, Tsp
Ch29	Macho	Mediano	Rawson	Neg
Ch31	Macho	Chico	Rawson	Dc
Ch32	Macho	Grande	Rawson	Neg
Ch33	Hembra	Mediano	Rawson	Neg
Ch34	Macho	Mediano	Rawson	Neg
Ch35	Macho	Grande	Rawson	To, Dc, Th
Ch36	Hembra	Chico	Rawson	Neg
Ch37	Macho	Grande	Rawson	Th, To
Ch38	Hembra	Grande	Rawson	Th
Ch39	Macho	Grande	Comodoro	To
Ch40	Macho	Chico	Comodoro	Neg
Ch41	Hembra	Chico	Comodoro	To
Ch42	Macho	Mediano	Comodoro	Neg
Ch44	Hembra	Mediano	Comodoro	To
Ch45	Hembra	Mediano	Comodoro	Th, To
Ch46	Macho	Grande	Comodoro	Eg
Ch51	Hembra	Grande	Comodoro	To
Ch52	Macho	Grande	Comodoro	Dc
Ch53	Macho	Chico	Comodoro	Neg
Ch54	Hembra	Chico	Comodoro	To, Dc
Ch55	Macho	Mediano	Senguer	Eg

Ch56	Macho	Mediano	Senguer	To, Tsp, Dc
Ch57	Macho	Grande	Senguer	Eg
Ch58	Macho	Mediano	Senguer	To
Ch59	Macho	Grande	Senguer	Tsp
Ch60	Macho	Mediano	Senguer	Tsp
Ch61	Macho	Mediano	Senguer	Dc
Ch62	Macho	Grande	Senguer	Eg, To
Ch63	Macho	Mediano	Senguer	Dc
Ch64	Macho	Mediano	Senguer	Neg
Ch65	Macho	Mediano	Senguer	Eg
Ch66	Macho	Mediano	Senguer	Neg
Ch67	Hembra	Grande	Senguer	Neg
Ch68	Hembra	Mediano	Senguer	Dc
Ch69	Macho	Grande	Senguer	Tsp
Ch70	Macho	Grande	Senguer	Tsp
Ch71	Macho	Mediano	Senguer	Neg
Ch72	Macho	Mediano	Senguer	Neg
Ch73	Macho	Grande	Trelew	Eg, To
Ch74	Hembra	Mediano	Trelew	To
Ch75	Hembra	Grande	Trelew	To
Ch76	Hembra	Mediano	Trelew	To
Ch77	Hembra	Chico	Trelew	To
Ch78	Hembra	Mediano	Trelew	Tsp, To
Ch81	Macho	Grande	Trelew	Dc
Ch82	Hembra	Mediano	Trelew	Neg
Ch83	Hembra	Chico	Trelew	Neg
Ch84	Hembra	Chico	Sarmiento	Neg
Ch85	Macho	Grande	Sarmiento	Tsp, To
Ch86	Macho	Grande	Sarmiento	Neg
Ch87	Hembra	Mediano	Sarmiento	Tsp
Ch88	Macho	Grande	Sarmiento	Tsp

Ch89	Macho	Grande	Sarmiento	Tsp, To
Ch90	Hembra	Mediano	Sarmiento	Eg
Ch91	Macho	Grande	Sarmiento	Neg
Ch93	Macho	Grande	Sarmiento	Eg, Tsp
Ch94	Hembra	Grande	Sarmiento	Neg
Ch95	Macho	Chico	Sarmiento	Neg
Ch96	Hembra	Chico	Sarmiento	To
Ch97	Macho	Mediano	Sarmiento	Neg
Ch98	Hembra	Grande	Sarmiento	To
Ch99	Hembra	Mediano	Sarmiento	Neg
Perú 1	Hembra	Mediano	San Juan	Eg (47), Dc
Perú 2	Macho	Chico	Canchayllo	Neg
Perú 3	Hembra	Mediano	Canchayllo	Eg (9), Tx (2)
Perú 4	Macho	Mediano	Canchayllo	Neg
Perú 5	Hembra	Mediano	San Juan	Eg (10.000), Tx, Dc
Perú 6	Hembra	Mediano	Canchayllo	Neg
Perú 7	Macho	Mediano	San Juan	Dc
Perú 8	Macho	Mediano	San Juan	Eg (1.000), Tx, Th (2)
Perú 10	Hembra	Mediano	San Juan	Eg (1.000), Th (2), Dc
Perú 11	Hembra	Chico	San Juan	Eg (> 1.000), Th (1), Tx (5)
Perú 12	Hembra	Chico	Canchayllo	Neg

TABLA 3. Resultados de necropsias de perros de campo. Las muestras identificadas Ch provienen de Chubut, Argentina, las de Perú son del departamento de Junín. Eg: *E. granulosus*, Th: *T. hydatigena*, Tsp: *Taenia spp.* sin clasificar, To: *Toxocara canis*, Tx: parásitos de la familia *Toxocaridae*, Dc: *Dipylidium caninum*, Tv: *Trichuris vulpis*. En las muestras de Junín se aclara entre paréntesis las cantidades encontradas.

Nueve de los 85 perros de Chubut y 6 de los 11 provenientes de Junín fueron positivos para *E. granulosus* (15,6%). Cuarenta y ocho animales estaban infectados con otros parásitos y 33 resultaron negativos, **TABLA 3.** Dentro de los otros parásitos encontrados figuraban *T. hydatigena*, *Taenia sp.*, *D. caninum*, *T. canis*, *T. vulpis* y

parásitos de la familia Toxocaridae sin clasificar. Lamentablemente, no fue posible realizar un conteo de los parásitos encontrados en los perros provenientes de Chubut. Asimismo, en algunos casos no se pudo identificar el género dentro de la familia Taeniidae, por lo cual se informaron como *Taenia* spp.

Las materias fecales fueron analizadas con ambos coproELISAs, CPR39 y Eg9, y el valor de corte fue establecido mediante el análisis de curvas ROC (Hanley and McNeil, 1982), con el fin de lograr un balance entre sensibilidad y especificidad. El cut-off fue definido en 0,224 UA y 0,340 UA, para coproELISA CPR39 y Eg9, respectivamente. Utilizando estos valores, la sensibilidad (Verdaderos Positivos/(Verdaderos Positivos + Falsos Negativos) x 100) de los ensayos fue de 80,0 y 86,6% respectivamente, **TABLA 4**.

Resultados de Necropsia	Total	CPR39 +	Eg9 +
Eg (y otros)	15	12	13
Tsp	8	3	3
Tsp To Dc	3	1	3
Tsp To	6	4	3
To	17	1	1
Dc	10	2	0
To Dc	3	0	0
Tv	1	0	0
Negativos	33	3	1
Sensibilidad		80.0%	86.6%
Especificidad		82.7%	86.4%

TABLA 4. Análisis de muestras de campo por necropsia y coproELISA. Eg: *E. granulosus*, Tsp: *Taenia* spp., Dc: *Dipylidium caninum*, To: *Toxocara canis*, Tv: *Trichuris vulpis*. CPR + y Eg9 + indican las muestras que fueron clasificadas como positivas por cada ensayo.

Cuando las muestras de los perros infectados experimentalmente fueron analizadas utilizando el coproELISA Eg9 y estos valores de cut-off, todos los perros portadores de

E. granulosus resultaron positivos. Ampliando entonces la muestra de perros positivos por necropsia con estos animales, la estimación de la sensibilidad del método trepa al 92.6%. Por otro lado, la especificidad (Verdaderos Negativos/(Verdaderos Negativos + Falsos Positivos) x 100) del test con Eg9 también fue superior, 86,4% versus 82,7% con el coproELISA CPR39.

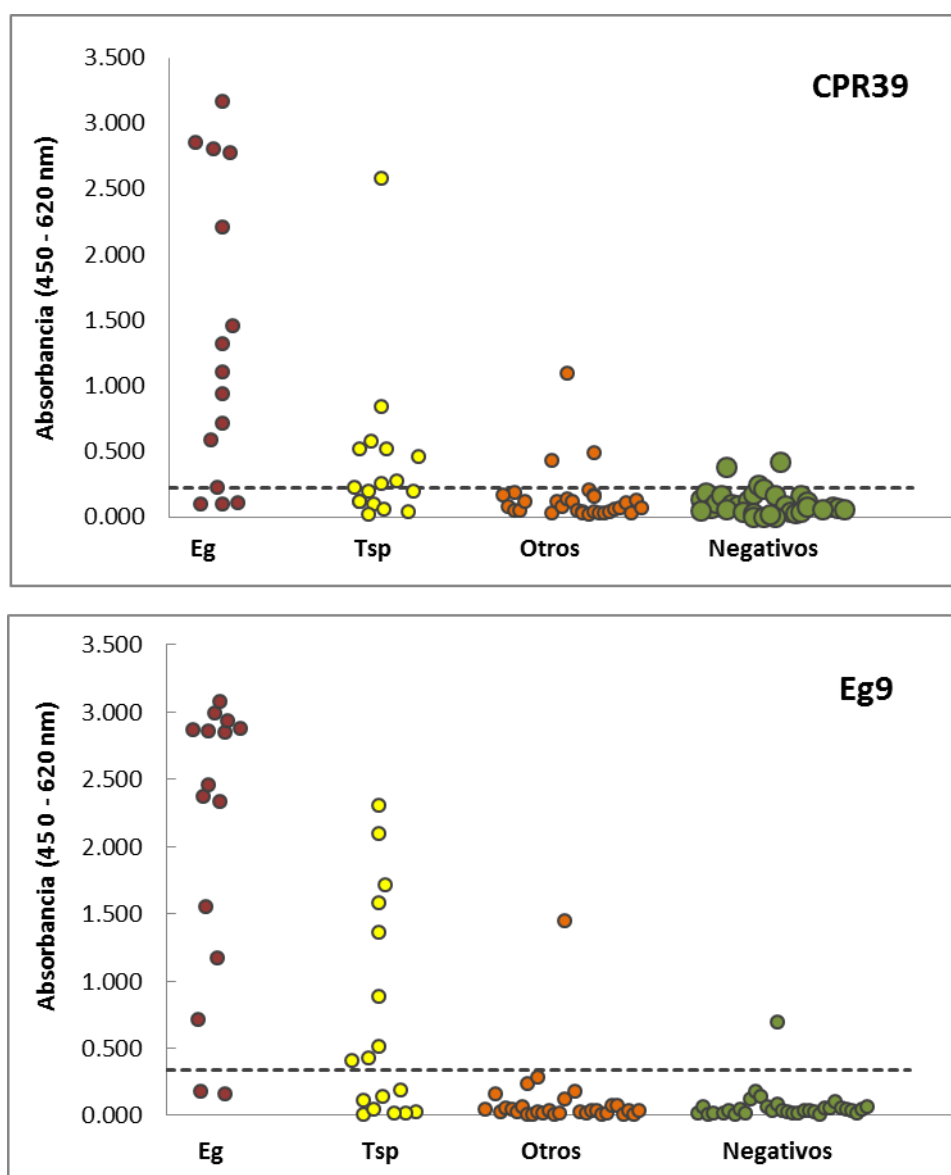


FIGURA 19. Análisis de muestras de campo con coproELISAs CPR39 y Eg9. Las materias fecales de perros de campo fueron agrupadas de acuerdo a los parásitos encontrados en la necropsia de la siguiente manera: Eg: *E. granulosus* solo o con otros helmintos; Tsp: *Taenia* spp. sola o con otros helmintos no *E. granulosus*; Otros: otros helmintos; Negativos: perros sin helmintos. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Las líneas punteadas corresponden al valor cut-off calculado mediante análisis de curvas ROC (0,224 UA para CPR39 y 0,340 UA para Eg9).

Adicionalmente, el ELISA CPR39 produjo una gran cantidad de lecturas cercanas al valor de corte (**FIGURA 19**), lo cual puede resultar problemático para el uso de un calibrador interno que funcione como cut-off (ver más abajo), debido a que mínimas variaciones inter-ensayos en la lectura de dicho calibrador, podrían provocar cambios importantes en la clasificación de las muestras dentro de cada categoría. De hecho, si las muestras que se encuentran entre $\pm 10\%$ del valor cut-off se consideran indeterminadas, lo cual es una práctica común en este tipo de ensayos, 4 de las muestras analizadas con CPR39 entrarían en esa categoría, mientras que ninguna de las muestras analizadas con Eg9 resultaría indeterminada.

Mientras que no fue posible realizar un conteo exacto de los parásitos diagnosticados en Chubut, sí pudo llevarse a cabo un análisis minucioso en el caso de los animales necropsiados en la provincia de Junín. Si bien la mayoría de los animales tenía un gran número de parásitos, hubo dos perros (Nº 1 y 2) con baja carga. Estos perros permitieron acumular mayor evidencia sobre la capacidad del método de detectar perros con pocos parásitos. En efecto, luego de un examen exhaustivo, se encontraron 9 *E. granulosus* y 2 parásitos de la familia Toxocaridae, en el perro Nº 1, y 47 *E. granulosus* y una escasa cantidad de *D. caninum*, en el perro Nº 2, **TABLA 3**. Interesantemente, el promedio de lecturas de absorbancia en ambas materias fecales fue de 1,160 y 2,990 UA respectivamente, que corresponden a resultados positivos muy claros, confirmando la buena sensibilidad del test y la capacidad de detectar animales con una baja carga.

A pesar de que el AcMo Eg9 fue seleccionado por su baja reactividad con antígenos de *T. hydatigena*, la reactividad cruzada fue mayormente contra perros infectados con *Taenia* spp. (sobre todo *T. hydatigena*), sola o junto con otros parásitos (**TABLA 4**, **FIGURA 19**). Únicamente un perro infectado con *T. canis* (1,440 UA) y uno negativo (0,694 UA), provenientes de la provincia de Chubut, fueron clasificados como falsos positivos por el coproELISA Eg9. Las altas lecturas observadas en ambos casos eran inesperadas y basándose en el hecho de que todas las demás muestras (20) que tenían *T. canis*, sola o con *D. caninum*, mostraron valores de absorbancia bajos, se puede sospechar un error de diagnóstico en la necropsia. Como se ha comentado, la

reactividad cruzada fue esencialmente contra el género *Taenia*. A pesar de que no se pudieron identificar las especies de todas las tenias, la gran mayoría de las muestras de Chubut y todas las de Junín correspondían a *T. hydatigena*, por lo tanto, en casi todos los casos, los falsos positivos estarían relacionados con animales comedores de vísceras.

En este punto, la pregunta que surge es: ¿cómo estos valores de sensibilidad (92.6%) y especificidad (86.4%) encajan en los estudios de relevamiento de infección canina?. Para esto es importante conocer los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) definidos como:

- $VPP = \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}}{(\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}) + (1 - \text{Especificidad}) \times (1 - \text{Prevalencia})}$
- $VPN = \frac{\text{Especificidad} \times (1 - \text{Prevalencia})}{(1 - \text{Sensibilidad}) \times \text{Prevalencia} + \text{Especificidad} \times (1 - \text{Prevalencia})}$

Estos valores relacionan los parámetros de sensibilidad y especificidad del ensayo con la prevalencia de la enfermedad en cada país. La estimación de los valores predictivos positivo y negativo permite conocer la probabilidad real de que los animales tengan o no la patología. En el caso de nuestro país, con una prevalencia de 4,3% determinada en 2004 (Irabedra, 2009), el VPP fue de 22,2% mientras que el VPN presentó un porcentaje elevado de 99,3%, para el coproELISA Eg9. Esto indica que la probabilidad de que los animales clasificados como positivos tengan la enfermedad es de sólo 22,2%, mientras que es altamente probable que los resultados negativos correspondan a animales sin *E. granulosus*. Esto es relevante para una técnica utilizada como método de monitoreo en campañas de control, ya que si bien tiende a sobreestimar la prevalencia, coloca los resultados en el lado “seguro”. El VPP cambia notoriamente si la prevalencia de la enfermedad es mayor, como en el caso de Perú. Utilizando una prevalencia de 46,1%, obtenida en el análisis de 52 muestras de la provincia de Junín (ver más adelante), el VPP asciende a 84,5%, mientras que el VPN desciende a 88,3%, para coproELISA Eg9. Queda demostrada así, la importancia de tener en cuenta la prevalencia de cada país al momento de interpretar los resultados, en el marco de las campañas de control existentes.

FORMULACIÓN DEL ENSAYO EN UN FORMATO DE KIT DIAGNÓSTICO

Dado que uno de los objetivos de esta tesis fue la obtención de un ensayo que pudiera avanzar más allá de la etapa de prototipo, se trabajó en los aspectos que pudieran facilitar su uso, su estabilidad, su transferencia a otros laboratorios, y su eventual fabricación como un kit comercial.

Calibrador. La estimación del cut-off del ensayo, que se describió en la sección anterior, es un punto crítico para clasificar positivos y negativos, pero debido a las variaciones de temperatura, humedad, lavados, sustrato, etc., el valor numérico como tal no puede extrapolarse a ELISAs realizados en otros días u otros laboratorios, aun utilizando los mismos reactivos. Tampoco tiene sentido práctico realizar la determinación del cut-off cada vez que se van a diagnosticar muestras. Por esta razón, se realizaron diluciones del antígeno EgSm (por ser el más fácil de preparar), hasta encontrar aquella que reprodujera el valor cut-off, en experimentos en los que se incluían las muestras positivas y negativas. Esta solución, que actúa como “calibrador” se estabilizó con la adición de 5% glicerol, 0,1% Kathon en PBS. Los valores de absorbancia que se encuentran por encima del valor promedio del calibrador se consideran resultados positivos y los que presentan valores menores negativos. Valores de absorbancia entre $\pm 10\%$ del valor cut-off se definen como indeterminados, y deben repetirse. La estabilidad en el tiempo del calibrador se ensayó como se resume más abajo.

Estabilización de placas sensibilizadas. En términos de la formulación de un kit de ELISA es necesario secar las placas para poder almacenarlas. Luego de algunos experimentos preliminares, se probaron distintas soluciones estabilizadoras que se agregaron luego de la sensibilización y bloqueo. A continuación las placas se secaron durante 1 h en un gabinete a temperatura ambiente y con humedad controlada ($\sim 40\%$), envasándose en bolsas de aluminio sellable conteniendo un desecante, y conservándose a 4°C . En la **FIGURA 20**, se muestra la señal obtenida con el calibrador, con una muestra positiva y una negativa de la infección experimental, luego de una semana de almacenamiento. Los resultados obtenidos con trealosa y sacarosa son similares, y el agregado de estos aditivos produce una señal que es incluso mayor que la obtenida con una placa fresca.

Se adoptó la solución conteniendo 5% de sacarosa por el buen resultado y el menor costo respecto a la trealosa.

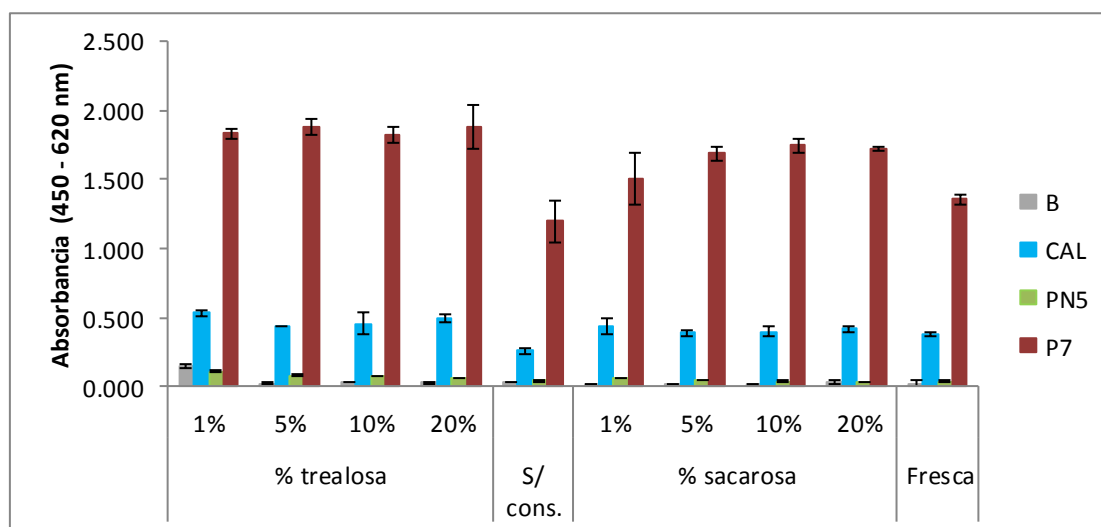


FIGURA 20. Comparación de soluciones estabilizadoras de microplacas sensibilizadas. Las soluciones fueron preparadas con PBS-0,1% BSA-0,02% azida de sodio y diferentes % de trealosa o sacarosa. Una placa fue secada sin agregado de conservantes. Los resultados fueron contrastados contra una placa fresca, sin secar, a la semana de almacenamiento. B: blanco, CAL: calibrador, PN5: perro negativo, P7: perro positivo (128 parásitos). Se colocaron barras de error con $\pm$ desvío estándar de cada muestra.

Con esta solución protectora se preparó un lote de placas que se almacenaron a 4°C y se probaron periódicamente con un panel compuesto por 3 muestras negativas y 3 muestras positivas con baja carga de parásitos (P6, P7 y P9), **FIGURA 22A**. Se observó que las placas secadas presentaban una capacidad discriminativa, entre muestras negativas y positivas bajas, similar a la obtenida con placas frescas sin secar, durante al menos un año de almacenamiento a 4°C. Resultados comparables se han encontrado tras 2 años de almacenamiento (no mostrados).

Preparación en el formato “pronto para usar” de los otros componentes del kit. En el caso del calibrador, la estabilidad se estudió a lo largo de 180 días a 4°C, a temperatura ambiente y a 37°C, los dos últimos se muestran en la **FIGURA 22B**. En ningún caso se observó una pérdida de señal respecto a la preparación fresca del calibrador. Para el AcMo Eg9, se probaron distintos aditivos, dos de los cuales se reseñan en la **FIGURA**

22C. La reactividad del AcMo Eg9 comenzó a disminuir a partir de los 10 días a 37°C, pero se mantuvo altamente estable durante 6 meses a 4°C (no mostrado) o a temperatura ambiente. Finalmente, se adoptó la solución estabilizada con Kathon.

A causa de la actividad enzimática asociada, el componente más crítico del ensayo fue el segundo anticuerpo. Se estudiaron numerosas formulaciones de las cuales sólo se muestran dos de las mejores, **FIGURA 22D**. A 37°C las dos soluciones perdían rápidamente la actividad luego de unos días, pero utilizando Kathon, BSA y TMB (tetrametilbencidina) el conjugado se mantuvo estable por 150 días, tanto a temperatura ambiente como a 4°C (no mostrado).

Debido a la disponibilidad comercial del sustrato TMB listo para usar, no se persiguió la preparación de dicho componente durante este trabajo. Al final, se concluyó que si todos los componentes del ensayo se mantuvieron estables durante 3 meses a temperatura ambiente, tendrán seguramente una vida útil mucho mayor en condiciones refrigeradas, **FIGURA 21**, lo cual es una ventaja muy conveniente para el envío del kit a temperatura ambiente y para su uso en lugares remotos.



FIGURA 21. Formulación del ensayo en formato kit. Los componentes del ensayo, a excepción del sustrato, fueron estables a temperatura ambiente por al menos 3 meses.

Cabe destacar que, en caso de una alta demanda del kit, será necesaria la preparación de nuevos anticuerpos policlonales. Según la experiencia obtenida durante este

proyecto, éste es un componente crítico de la técnica. De todas formas, experimentos preliminares con un panel de 3 o 4 conejos inmunizados con EgE/S y EgSm, y ensayos contra muestras de baja carga y de perros infectados con *T. hydatigena*, indican que no sería difícil reproducirlo, y se dispone de la colección de muestras campo y de infección experimental para su optimización. Por otra parte, se está teniendo especial cuidado en la conservación del hibridoma productor del AcMo Eg9, el cual se encuentra almacenado en tanque de nitrógeno y en freezer a -80°C , y periódicamente es descongelado y congelado para asegurar su viabilidad.

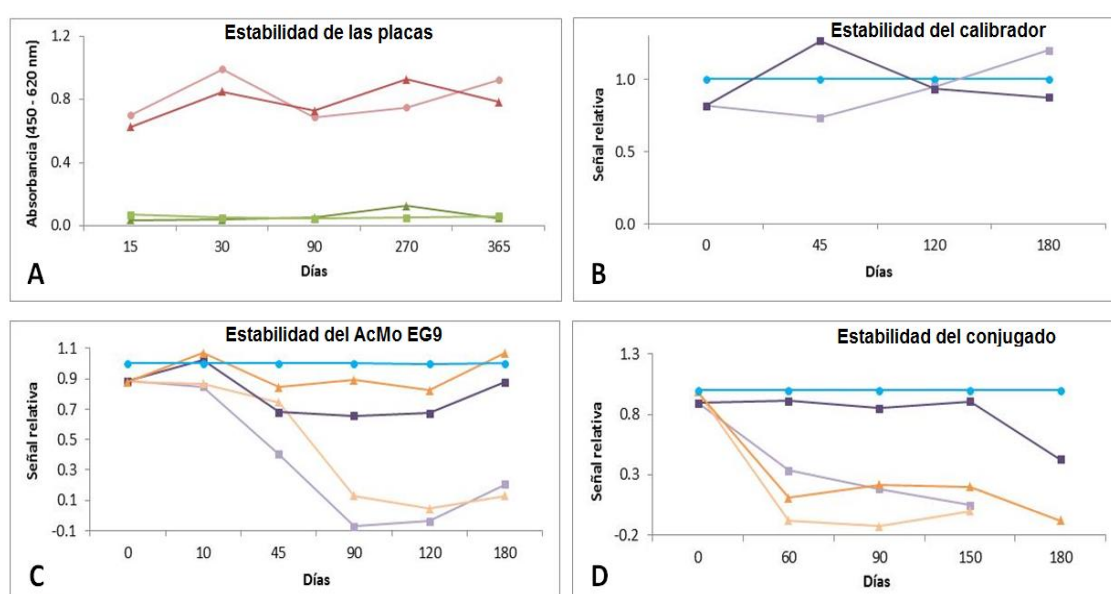


FIGURA 22. Estabilidad a lo largo del tiempo de los diferentes componentes del kit de coproELISA. A) Placas secadas versus placas frescas (triángulos y círculos respectivamente), las mismas fueron testeadas periódicamente con 3 muestras positivas débiles y 3 muestras negativas (el promedio de las mismas se observa en tonos de rojo (positivas) y verde (negativas)). **B-D)** Todos los valores obtenidos fueron normalizados en relación con la señal del reactivo fresco (línea turquesa). **B)** Soluciones del calibrador diluido en PBS - 5% glicerol - 0,1% Kathon CG, almacenadas a 37°C y a temperatura ambiente (violeta claro y oscuro, respectivamente). **C)** Estabilidad del AcMo Eg9 en distintos conservantes: cuadrado, en PBS-T - 0,1% Kathon CG, triángulo, en PBS-T - 0,05% azida de sodio; se observan en tonos claros las soluciones almacenadas a 37°C y en más oscuro los resultados de almacenamiento a temperatura ambiente. **D)** Estabilidad del conjugado anti-mouse IgG-PO diluido en PBS - BSA - 0,1% Kathon CG - 0,1 mM TMB (cuadrados) o en PBS - BSA (triángulos); se muestra el resultado de las diluciones guardadas a 37°C (tonos claros) o a temperatura ambiente (tonos oscuros).

Una de las motivaciones para la realización de este trabajo surgió debido a la necesidad de la CNZ de contar con un método confiable y disponible en el tiempo, para el diagnóstico de la equinocosis canina, que sustituyera al kit comercial en uso, el cual se discontinuaría. Por tanto, una vez formulado el kit coproELISA Eg9, se comparó con el kit comercial (Echino Test, JICA: Japan International Cooperation Agency) que utilizaba dicha institución. El kit comercial fue desarrollado para el diagnóstico de *E. multilocularis* y utiliza un AcMo denominado EmA9 (Kohno et al., 1995; Malgor et al., 1997; Sakai et al., 1995). Para realizar la comparación se analizaron las 96 muestras de necropsias de campo, y se utilizó el método de ROC y el parámetro z para la comparación estadística de los resultados, utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.0 (Hanley and McNeil, 1982). Del análisis de las curvas obtenidas (**FIGURA 23**) interesaban sobre todos los valores de área bajo la curva (ABC) y error estándar (EE) de cada ensayo. Estos valores permitieron calcular el valor z de la siguiente manera:

$$z = (ABC_{Eg9} - ABC_{EmA9}) / \sqrt{EE_{Eg9}^2 + EE_{EmA9}^2 - 2R \times EE_{Eg9} \times EE_{EmA9}}$$

El coeficiente de correlación R se surge de la tabla presente en la publicación mencionada y relaciona el promedio de las ABC y el promedio entre r_A y r_N , siendo r_A el coeficiente de Pearson correspondiente a los pacientes enfermos, mientras que r_N relaciona pacientes no enfermos. De esta manera no sólo se comparó el error estándar entre ambas ABC sino que se tuvieron en cuenta las pequeñas variaciones que podían surgir en cada ABC por el estudio de una misma muestra dos veces. El valor z calculado fue de 1,59. En este método de comparación se concluye que, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, si el valor z es menor que 1,96 ambos métodos tienen un valor diagnóstico equivalente.

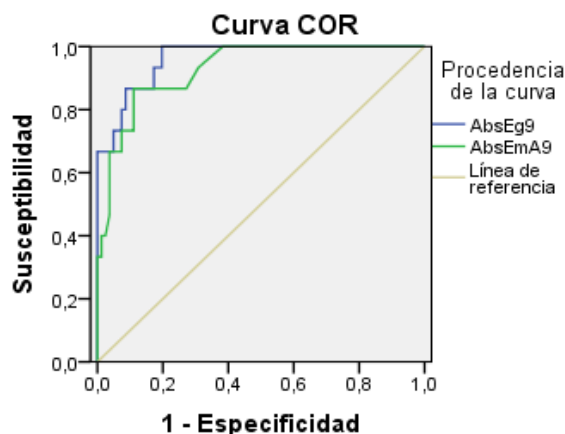
A

Resumen del proceso de casos

Clasificación	N válido (según lista)
Positivo ^a	15
Negativo	81

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

a. El estado real positivo es 1.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste	Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
AbsEg9	,961	,020	,000	,922	1,000
AbsEmA9	,928	,031	,000	,866	,989

La variable (o variables) de resultado de contraste: AbsEmA9 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

B

Correlaciones - rA				Correlaciones - rN			
		Eg9P	EmA9P			Eg9N	EmA9N
Eg9P	Correlación de Pearson	1	,869	Eg9N	Correlación de Pearson	1	,804
	Sig. (bilateral)		,000		Sig. (bilateral)		,000
	Suma de cuadrados y productos cruzados	15,563	18,101		Suma de cuadrados y productos cruzados	17,702	19,378
	Covarianza	1,112	1,293		Covarianza	,221	,242
	N	15	15		N	81	81
EmA9P	Correlación de Pearson	,869	1	EmA9N	Correlación de Pearson	,804	1
	Sig. (bilateral)	,000			Sig. (bilateral)	,000	
	Suma de cuadrados y productos cruzados	18,101	27,878		Suma de cuadrados y productos cruzados	19,378	32,799
	Covarianza	1,293	1,991		Covarianza	,242	,410
	N	15	15		N	81	81

FIGURA 23. Comparación estadística entre el coproELISA Eg9 y el kit comercial EmA9. Un panel de 96 muestras de necropsias de campo fue analizado en paralelo con ambos tests. En A se muestran las curvas ROC y los valores de área bajo la curva y error estándar obtenido en cada caso. En B se observan los coeficientes de correlación de Pearson rA (naranja) y rN (verde). Los cálculos fueron realizados con el programa IBM SPSS Statistics 20.0.

Adicionalmente, se tuvo la oportunidad de comparar ambos métodos, mediante el análisis en paralelo de muestras de campo recolectadas por técnicos de la CNZ, en todo el país, durante el año 2011. De las 244 materias analizadas, TABLA 5, se encontraron resultados coincidentes en un 93,8% de las mismas, Un 5,3% y un 4,9% de los perros fueron clasificados como positivos por Echino Test y coproELISA Eg9, respectivamente.

	EmA9	Eg9
Total	244	244
Negativas	228	231
Coincidencia negativas	223	
Positivas	13	12
Coincidencia positivas	6	
Indeterminadas	4	1
Coincidencia indeterminadas	0	

TABLA 5. Comparación entre coproELISA Eg9 y kit comercial EmA9, con muestras de campo provenientes de zonas de riesgo de todo el país. Se analizaron 244 muestras con resultado desconocido (sin necropsia), encontrándose coincidencia en 93,8% de los resultados.

Con los resultados obtenidos, se pudo inferir que el desempeño del coproELISA Eg9 es significativamente similar al del kit comercial japonés, y desde el año 2012 se decidió reemplazar este último por el test producido en este estudio, como técnica de diagnóstico canino de la equinocosis, en el marco de la campaña de control de la hidatidosis llevada a cabo por la Comisión Nacional de Zoonosis.

REPRODUCIBILIDAD Y APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE CAMPO

La formulación del test en formato de kit, permitió realizar ensayos de transferencia a otros laboratorios y evaluar la reproducibilidad inter-laboratorios de los resultados. Utilizando la plataforma de colaboración con Perú, que se menciona más abajo, se transfirió el ensayo a dos laboratorios de Lima. La reproducibilidad del ensayo se evaluó mediante el análisis de 52 muestras obtenidas en la provincia de Junín (Canchayllo y Jauja), Perú. Alícuotas de estas muestras se examinaron en ciego en los dos laboratorios de Lima: Instituto Nacional de Salud (INS) y Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), y en la Cátedra de Inmunología de Facultad de Química de Uruguay. Las heces fueron analizadas por triplicado y clasificadas como positivas, negativas o indeterminadas, **TABLA 6**. Veinticuatro muestras fueron consideradas positivas, indicando una prevalencia de 46,1% en las zonas estudiadas. El kit tuvo buen desempeño, con excelente reproducibilidad y todas las muestras fueron clasificadas en la misma categoría por los tres laboratorios, a excepción de dos que presentaron valores de absorbancia muy cercanos al calibrador (cut-off), una de ellas fue informada como negativa por dos laboratorios e indeterminada por el tercero, mientras que la otra fue clasificada como positiva (débil) por dos laboratorios e indeterminada por el restante.

N°	FQ	DIGESA	INS	N°	FQ	DIGESA	INS
1R	1.745	1.593	1.331	28R	2.245	1.887	1.767
2R	0.106	0.395	0,225	29R	0.133	0.179	0,188
3R	0.294	0.346	0,336	30R	0.18	0.232	0,288
4R	0.008	0.2	0,216	31R	2.308	1.624	1.413
5R	0.614	1.206	0,840	32R	0.048	0.103	0,106
6R	1.428	1.983	1.488	33R	0	0.067	0,064
7R	0.407	1.024	0,604	34R	0.048	0.179	0,134
8R	0.074	0.345	0,171	35R	0.013	0.049	0,064
9R	0.005	0.17	0,053	36R	2.447	1.451	1.598
10R	1.207	1.375	0,806	37R	0.571	0.567	0,488
11R	0.002	0.25	0,061	38R	0.437	0.427	0,399
12R	0.019	0.16	0,085	39R	0.091	0.141	0,236
13R	-0.007	0.088	0,036	40R	0.611	0.47	0,622

14R	0.386	0.328	0,300	41R	0.163	0.171	0,329
15R	0.011	0.097	0,054	1N	2.992	1.861	2.203
16R	0.172	0.143	0,132	2N	0.033	0.069	0,197
17R	2.268	2.249	1.591	3N	1.163	0.588	0,553
18R	1.801	2.019	1.258	4N	0.013	0.082	0,042
19R	1.265	1.324	0.666	5N	3.073	2.108	2.219
20R	0.716	1.113	0,661	6N	0.044	0.116	0,113
21R	1.595	1.715	1.082	7N	0.279	0.366	0,312
22R	0.269	0.305	0,315	8N	2.876	2.165	2.252
23R	2.661	2.459	1.877	10N	2.849	1.893	1.811
24R	2.953	2.44	2.203	11N	2.93	1.815	2.092
25R	0.113	0.133	0,134	12N	0.057	0.143	0,135
26R	0.076	0.112	0,083	Cut-off	0.339	0.41	0.403
27R	0.078	0.18	0,121				

TABLA 6. Reproducibilidad del ensayo. Se muestran los resultados de absorbancia obtenidos del análisis en ciego de 52 materias fecales en 3 laboratorios diferentes: Cátedra de Inmunología de Facultad de Química (FQ), Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) e Instituto Nacional de Salud (INS), estos últimos de Perú. Se señalan en rosa los animales clasificados como positivos, sin color los negativos y en celeste los indeterminados. Al final de la tabla se muestra en valor de corte fijado por cada laboratorio.

APLICACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ENSAYO

Transferencia local. Como se mencionó anteriormente, la CNZ comenzó a utilizar el kit producido en Uruguay desde el año 2012. En dicho año se analizaron un total de 715 muestras, de las cuales, 484 pertenecían a animales de pueblos considerados de riesgo (74 pueblos de 17 departamentos del país) y las restantes 231 provenientes de establecimientos rurales con tropas de ganados que presentaron quistes hidáticos en los estudios de frigoríficos. Se encontró un 6,6% de materias positivas en los pueblos y 8,6% en perros de establecimientos positivos (resultados no publicados).

La disponibilidad del ensayo de manera sustentable y a un menor costo, permitió que la CNZ fuera más ambiciosa en la planificación anual, llevándose analizadas hasta

setiembre de 2013, 3145 materias fecales, provenientes de todo el país, un número significativamente mayor que el año anterior. Dentro de las muestras estudiadas hasta el momento, 2310 provienen de pueblos del interior y 835 pertenecen a establecimientos rurales (103 de ellos con ganado parasitado, diagnosticados en frigoríficos por técnicos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Se encontró positividad en un 1,8% de los perros provenientes de los pueblos y, dentro de los establecimientos rurales, en 3,9% de los animales pertenecientes a predios con ganado parasitado y en 1,8% del resto de los establecimientos (resultados preliminares no publicados). Un mejor monitoreo de la enfermedad conlleva importantes beneficios para la campaña de control en nuestro país, que redundará en diferentes intervenciones en el ambiente donde se encuentra un perro positivo: diagnóstico y tratamiento con praziquantel de todos los animales que conviven con dicho can, diagnóstico ecográfico de las personas relacionadas con el mismo, jornadas educativas para la población y finalmente tratamiento de las personas que resulten con diagnóstico confirmatorio de hidatidosis.

Transferencia Regional. Dada la escasez de un test comercial y la necesidad de abandonar la arecolina como método diagnóstico, actores de distintos programas de control se han interesado en la utilización del método. Por este motivo se firmó un TCC (Tratado de Cooperación Técnica) entre Uruguay y Perú, con el aval de la OPS, que tenía como meta principal la transferencia del ensayo y la capacitación de técnicos del Instituto Nacional de Salud y la Dirección General de Salud Ambiental de Perú. En este marco, se entrenaron técnicos de ambas instituciones en el laboratorio de la Cátedra de Inmunología, y se realizó el estudio piloto inter-laboratorio mencionado más arriba, con muestras de la provincia de Junín. Las actividades han continuado, y las autoridades de Perú han decidido implementar en los departamentos con mayores índices de la enfermedad, estudios pilotos de infección canina utilizando el coproELISA Eg9, que a futuro permita instrumentar un Programa de Control que al presente no existe en Perú. Los departamentos seleccionados fueron Pasco y Huancavelica, los cuales registran altas tasas de casos quirúrgicos en humanos, 79 y 39/100.000 habitantes, respectivamente; y también Junín y Puno, que presentan altas tasas de parasitación en animales (87 y 73%, respectivamente). En el marco del “Plan de

Prevención y Control de la Equinocosis Quística en el Perú 2012 – 2016”, la Dirección General de Salud Pública realizará un levantamiento de la infección canina en estas regiones de alta endemicidad. Hasta el momento se han analizado 923 animales, cuyos resultados se resumen en la **TABLA 7**. Las materias provenientes de Pasco y Puno han sido analizadas en el Instituto Nacional de Salud, mientras que las Huancayo y Huancavélica se estudiaron en el laboratorio de la Dirección General de Salud Ambiental.

Departamento	Nº muestras	Eg9+	% positivos
Pasco	351	192	54,7
Puno	150	20	13,3
Huancavélica	312	54	17,3
Huancayo	110	33	30,0

TABLA 7. Resultados de muestras analizadas en Perú durante el año 2013. Hasta el momento se estudiaron 923 muestras mediante coproELISA Eg9, provenientes de 4 departamentos que presentan equinocosis en forma altamente endémica.

Asimismo, en el año 2011 se transfirieron a Chile 12 kits, suficientes para el análisis de 500 materias fecales aproximadamente, y se encuentra en trámite la firma de un nuevo TCC con este país, a fin de ampliar el número de animales estudiados, en el marco del control de la enfermedad que se está llevando a cabo en Tierra del Fuego.

FORMATO RÁPIDO DEL ENSAYO

La disponibilidad del coproELISA Eg9 viene a llenar un vacío importante, dada la carencia de test comerciales para este diagnóstico. Sin embargo, la experiencia ganada durante este trabajo indica que sería necesario avanzar hacia un formato que permita el diagnóstico *in situ*. Esto es particularmente relevante en predios remotos y poco accesibles (ej. zonas andinas) donde una vez recogida la muestra, hay que

transportarla al laboratorio de referencia, y planificar el regreso para comunicar los resultados, localizar a los perros, e instrumentar las medidas correctivas. Para responder a esta necesidad se comenzó a adaptar el ensayo en un formato de flujo lateral. En el formato escogido, el AcPo es inmovilizado sobre tiras de nitrocelulosa y la muestra junto con un conjugado del AcMo, al migrar, son capturados en esta línea de reacción. La visualización de esta captura se hace posible debido a que el AcMo se encuentra conjugado a un pigmento; en nuestro caso carbón coloidal, **FIGURA 7**.

Un punto crítico a solucionar para este desarrollo fue la purificación del AcMo Eg9, etapa necesaria para su conjugación al carbón coloidal. El AcMo Eg9 no resistió la elución ácida al intentar purificarlo utilizando proteína G, aun usando condiciones de pH moderadas. Por esta razón se desarrolló un protocolo de purificación que consistió en la precipitación con sulfato de amonio, diálisis y purificación por intercambio catiónico. El anticuerpo así purificado se conjugó a carbón coloidal y luego de optimizar las concentraciones de AcPo en la línea de reacción, la concentración de anticuerpo anti-IgG de ratón en la línea de control y las condiciones de reacción, se montó el ensayo que se describe en la sección de métodos. Al momento se han definido las concentraciones óptimas de cada componente del ensayo y el tiempo de reacción, 15 minutos, que permite la mejor discriminación de muestras positivas y negativas. Este tiempo se ajustó basándose con las muestras de baja carga parasitaria que fueron las que demoraron más en ser visibles. Pasado este tiempo no se constató aparición de nuevas bandas en el caso de las negativas, ni incremento de color en las que ya estaban presentes.

La **FIGURA 24** ejemplifica el funcionamiento del test usando un panel de 7 muestras negativas y 10 positivas. Hasta el momento se analizaron todas las muestras experimentales negativas, positivas y con *T. hydatigena*; las 11 muestras de necropsias de Perú y 45 de las muestras provenientes de Chubut. Los resultados obtenidos presentaron un 100 % de concordancia con los resultados obtenidos con el coproELISA Eg9, es decir, todas las muestras clasificadas como positivas fueron visualizadas como tal en el ensayo inmunocromatográfico al igual que las negativas. Asimismo, se constató que las materias que presentaban valores altos de absorbancia en el coproELISA, mostraron bandas más intensas, que además, aparecieron rápidamente

durante la incubación. En contrapartida, las muestras positivas débiles, presentaron bandas tenues que se hacían visibles hacia el final de la incubación. Con estos resultados preliminares, parece ser que este formato presenta parámetros de sensibilidad y especificidad muy similares a los del coproELISA Eg9.

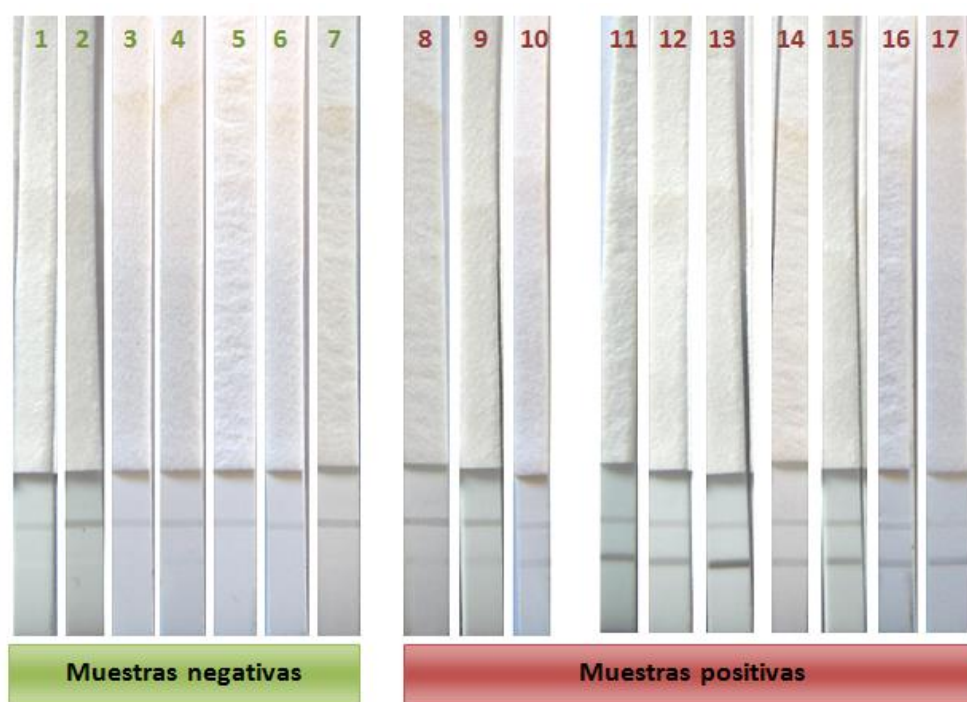


FIGURA 24. Análisis de muestras de materias fecales conocidas utilizando el test en formato de flujo lateral. La línea inferior consiste en una deposición de AcPo C4 en la tira de nitrocelulosa, mientras que la superior corresponde a un anticuerpo anti-IgG de ratón que actúa como control. La muestra (10 μ L) se mezcla con (10 μ L) del conjugado AcMo Eg9-carbón coloidal en un pozo de una placa de ELISA y la tira de nitrocelulosa se sumerge durante 15 minutos para hacer la lectura. Las muestras numeradas del 1-7 son negativas y de la 8-17 corresponden a muestras positivas experimentales o de campo analizadas por necropsia. Dentro de estas últimas, las 3 primeras corresponden a perros con baja carga parasitaria: 168, 128 y 47 parásitos respectivamente (P7, P6 y P11), y las siguientes son de animales con 1.000 parásitos o más (P2, P4, P8, P1, Perú8, Perú10, Perú11).

Queda pendiente realizar estudios de estabilidad de las tiras de nitrocelulosa sensibilizadas, optimizar la reproducibilidad y estabilidad de los otros reactivos que

componen el test (particularmente en el caso del conjugado de Eg9 con el carbón coloidal) y una vez optimizados estos componentes llevar adelante los correspondientes estudios de validación del test. En una etapa posterior podría abordarse el desarrollo una variante del test que incluya el conjugado Eg9-carbón adsorbido en un componente adicional de la tira, previo a la línea de reacción y por encima de la zona de contacto con la muestra, para lograr un ensayo libre de reactivos en solución.

DISCUSIÓN

Varios países llevan adelante programas de control de la hidatidosis que, a pesar de haberse prolongado por décadas, no han resultado exitosos. Esto ha llevado a una revisión de pautas que ha derivado en el planteo de nuevos enfoques, incluyendo la vacunación de la población ovina, el uso de modelos matemáticos y la desparasitación canina con drogas antihelmínticas de amplio espectro, entre otros (Craig et al., 2007). De estas revisiones se ha concluido que la intervención más efectiva es la vacunación del 90% del ganado ovino más la desparasitación canina con antihelmínticos (Craig et al., 2007). A su vez, resulta evidente que el monitoreo de la infección canina es un elemento fundamental a tener en cuenta en el planteo y evaluación de cada una de las etapas de un programa de control. Conocer la prevalencia de la enfermedad en perros permite establecer la dinámica de la enfermedad, definir zonas de riesgo donde intervenir, evaluar las acciones llevadas a cabo y realizar las correcciones que sean necesarias (Torgerson and Deplazes, 2009). Así mismo, la herramienta diagnóstica que resulta más apropiada, por su balance entre sensibilidad y especificidad, así como por su bajo costo y practicidad es el coproELISA, que permite la detección de antígenos de *E. granulosus* presentes en las heces del perro (Craig et al., 2003; Deplazes et al., 1992; Lahmar et al., 2007; Lopera et al., 2003). Si bien existen múltiples investigaciones y ensayos diseñados para el diagnóstico de la equinocosis canina, no hay actualmente disponibilidad de ningún kit comercial en el mercado.

Basados en esta premisa, se planteó el objetivo de producir un coproELISA validado con muestras regionales, que fuera económico y sustentable a largo plazo, que pudiera ser utilizado en nuestro país y adicionalmente, transferido a otros países de la región, ya sea para su aplicación en programas ya implementados o como diagnóstico inicial en aquellos lugares que no cuentan aún con campañas de control de la enfermedad. Considerando la importancia que tienen los anticuerpos en la determinación del desempeño del ensayo, en términos de sensibilidad, especificidad, y posibilidades de estandarización y reproducibilidad, se puso especial cuidado en la selección de anticuerpos, sobre todo, de los monoclonales. La importancia de este punto se evidenció a lo largo del proyecto al introducir nuevas estrategias de selección que

permitieron identificar el AcMo Eg9 que dio lugar a un coproELISA con mejoras significativas con respecto al primer AcMo elegido (CPR39). Aunque la caracterización del epítipo que reconoce este anticuerpo excedió el alcance de este trabajo, es interesante notar que, contrariamente a los antecedentes en el tema, no parece ser un epítipo glucídico, al menos uno que pueda ser destruido por el tratamiento con periodato. Por otro lado el proceso de selección utilizado en el *screening*, que se sesgó hacia la selección de componentes que fueran detectables en materias fecales de perros con baja carga, y en períodos tempranos de la infección, condujo a la selección de un anticuerpo con reactividad por un epítipo abundante en el material de E/S del parásito. Curiosamente, los casos de moderada reactividad cruzada con otros extractos se produjeron con antígenos de E/S de los mismos.

El coproELISA Eg9 desarrollado permite detectar muestras positivas antes del período prepatente, aún aquellas con muy bajas cargas de parásitos, y presenta una baja reactividad cruzada con la especie relacionada *T. hydatigena*, solamente pasados los 40 días de infección y con bajas lecturas. El análisis de las muestras de campo en combinación con las muestras de la infección experimental permitió establecer los parámetros de sensibilidad, 92,6 %, y especificidad del ensayo, 86,4%, en referencia a la técnica considerada el “gold standard” para el diagnóstico de la infección canina. Estos valores, si bien no alcanzan la meta de un diagnóstico absoluto, están entre los valores más altos reportados para métodos de diagnóstico de copro antígeno validados por necropsia. Como ocurre en todos los casos, los métodos diagnósticos solo pueden compararse apropiadamente si se realizan contra el mismo panel de muestras. De todas maneras, la sensibilidad del coproELISA Eg9 es comparable a la documentada por el meta-análisis llevado a cabo por (Allan and Craig, 2006), que fue de 83%. A la vez que se logró una mejora en la detección de perros con bajo número de parásitos, lográndose detectar un animal con sólo 9 parásitos de *E. granulosus*, los cuales son considerados problemáticos por muchos ensayos (Deplazes et al., 1992; Deplazes et al., 1994; Lahmar et al., 2007; Malgor et al., 1997). En cuanto a la reactividad cruzada, tiende a ocurrir principalmente en casos de infecciones con *Taenia* spp. y más específicamente contra *T. hydatigena*. En el marco de un programa de control de la hidatidosis, un resultado falso positivo de este tipo, estaría indicando

la infección con tenias vinculadas a animales que tienen acceso a carne y vísceras, con desparasitación insuficiente, indicando una situación que debe ser atendida por el programa en cuestión (Cavagion et al., 2005).

Una meta central de este trabajo fue desarrollar un ensayo que, además de tener un valor diagnóstico validado, pudiera ser reproducido en el tiempo y formulado en un formato de kit pronto para usar, que facilitara su utilización y transferencia a otros países del Cono Sur, en el marco del Proyecto implementado por la Organización Panamericana de la Salud. Este punto no sólo fue cumplido sino que, afortunadamente, el coproELISA Eg9 es la herramienta diagnóstica empleada por el Programa de Control de la CNZ en Uruguay, también ha sido adoptado por las autoridades de salud de Perú a tales efectos, y ya se ha comenzado la transferencia al Instituto Nacional de Salud de Chile. En cuanto a la disponibilidad del test, actualmente se cuenta con reactivos suficientes para el análisis de alrededor de 100.000 muestras, pero como se ha discutido, se cuenta con la colección de muestras de infección experimental y de campo que permitirán la caracterización de nuevas partidas del AcPo utilizado para la captura o del calibrador. Escapa de nuestro conocimiento, durante cuánto tiempo mantendrán la reactividad las muestras almacenadas a -80°C, aunque sabemos que los sobrenadantes cedidos por el Dr. Carmona la han conservado por más de 10 años. En lo que respecta al calibrador, se almacenaron también, diluciones del antígeno somático de *E. granulosus* (EgSm) que representan un estándar de referencia que servirá, en un futuro, para comparar con nuevos lotes de calibrador. Es también interesante señalar que el contar con ese panel de muestras caracterizadas por necropsia, podría servir, en un futuro, para la producción de nuevos AcMos. Dado que durante la producción del Eg9 no se contaba con dicho material, se podrían diseñar estrategias de selección más exigentes, capaces de generar un coproELISA más sensible y específico, que logre mejorar además, el valor predictivo positivo del ensayo, lográndose al final, una mejor estimación de la prevalencia en nuestro país.

Queda pendiente en este proyecto el cierre de la adaptación del ensayo en un formato rápido para diagnóstico *in situ*. Si bien los resultados preliminares son muy promisorios, falta definir la sensibilidad y especificidad del mismo, que si bien parecen ser iguales a las del coproELISA Eg9, deberían ser definidas una vez que se establezca y

optimice el ensayo. Restan realizar aún estudios que permitan su uso libre de reactivos en solución, y la realización de protocolos rápidos para la preparación de muestras *in situ*. Este formato puede hacer una gran diferencia en términos de la efectividad de los programas de control, que incluyen zonas remotas y de difícil acceso, ya que la obtención de un resultado inmediato le posibilitará al técnico veterinario, dosificar los animales de un predio positivo, así como gestionar estudios ecográficos en los humanos convivientes y otras acciones establecidas.

BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, I., Branzburg, A., Campos-Ponce, M., Abdel Hafez, S.K., Raoul, F., Craig, P.S., Hamburger, J., 2003. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg* 69, 324-330.

Allan, J.C., Craig, P.S., 2006. Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. *Parasitol Int* 55 Suppl, S75-80.

Allan, J.C., Craig, P.S., Garcia Noval, J., Mencos, F., Liu, D., Wang, Y., Wen, H., Zhou, P., Stringer, R., Rogan, M., et al., 1992. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology* 104 (Pt 2), 347-356.

Atías, A., 1999. *Parasitología médica*. Mediterráneo, Chile.

Battelli, G., 2004. Socio-economic impact of cystic echinococcosis and of its control: some data and considerations. *Parassitologia* 46, 359-362.

Boufana, B.S., Campos-Ponce, M., Naidich, A., Buishi, I., Lahmar, S., Zeyhle, E., Jenkins, D.J., Combes, B., Wen, H., Xiao, N., Nakao, M., Ito, A., Qiu, J., Craig, P.S., 2008. Evaluation of three PCR assays for the identification of the sheep strain (genotype 1) of *Echinococcus granulosus* in canid feces and parasite tissues. *Am J Trop Med Hyg* 78, 777-783.

Brunetti, E., Garcia, H.H., Junghanss, T., 2011. Cystic echinococcosis: chronic, complex, and still neglected. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1146.

Casaravilla, C., Freire, T., Malgor, R., Medeiros, A., Osinaga, E., Carmona, C., 2003. Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *J Parasitol* 89, 709-714.

Casaravilla, C., Malgor, R., Rossi, A., Sakai, H., Nonaka, N., Kamiya, M., Carmona, C., 2005. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection. *Parasitol Int* 54, 43-49.

Cavagion, L., Perez, A., Santillan, G., Zanini, F., Jensen, O., Saldia, L., Diaz, M., Cantoni, G., Herrero, E., Costa, M.T., Volpe, M., Araya, D., Rubianes, N.A., Aguado, C., Meglia, G., Guarnera, E., Larrieu, E., 2005. Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. *Vet Parasitol* 128, 73-81.

Christofi, G., Deplazes, P., Christofi, N., Tanner, I., Economides, P., Eckert, J., 2002. Screening of dogs for *Echinococcus granulosus* coproantigen in a low endemic situation in Cyprus. *Vet Parasitol* 104, 299-306.

Craig, P.S., Gasser, R.B., Parada, L., Cabrera, P., Parietti, S., Borgues, C., Acuttis, A., Agulla, J., Snowden, K., Paolillo, E., 1995. Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Vet Parasitol* 56, 293-301.

Craig, P.S., McManus, D.P., Lightowers, M.W., Chabalgoity, J.A., Garcia, H.H., Gavidia, C.M., Gilman, R.H., Gonzalez, A.E., Lorca, M., Naquira, C., Nieto, A., Schantz, P.M., 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 7, 385-394.

Craig, P.S., Rogan, M.T., Campos-Ponce, M., 2003. Echinococcosis: disease, detection and transmission. *Parasitology* 127 Suppl, S5-20.

D'Alessandro, A., Rausch, R.L., 2008. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clin Microbiol Rev* 21, 380-401, table of contents.

de la Rue, M.L., 2008. Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50, 53-56.

Dematteis, S., Piroto, F., Marques, J., Nieto, A., Orn, A., Baz, A., 2001. Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus*

granulosus protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice. *Parasite Immunol* 23, 1-9.

Deplazes, P., Gottstein, B., Eckert, J., Jenkins, D.J., Ewald, D., Jimenez-Palacios, S., 1992. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol Res* 78, 303-308.

Deplazes, P., Jimenez-Palacios, S., Gottstein, B., Skaggs, J., Eckert, J., 1994. Detection of *Echinococcus* coproantigens in stray dogs of northern Spain. *Appl Parasitol* 35, 297-301.

Dinkel, A., Njoroge, E.M., Zimmermann, A., Walz, M., Zeyhle, E., Elmahdi, I.E., Mackenstedt, U., Romig, T., 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus* granulosus-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol* 34, 645-653.

Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F., Pawlowski, Z.S., 2002. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health.

el-Shehabi, F.S., Kamhawi, S.A., Schantz, P.M., Craig, P.S., Abdel-Hafez, S.K., 2000. Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen detection with necropsy in stray dogs and red foxes from northern Jordan. *Parasite* 7, 83-90.

Elayoubi, F.A., Craig, P.S., 2004. *Echinococcus* granulosus coproantigens: chromatographic fractionation and characterization. *Parasitology* 128, 455-465.

Elayoubi, F.A., Fraser, A., Jenkins, D.J., Craig, P.S., 2003. Partial characterisation of carbohydrate-rich *Echinococcus* granulosus coproantigens. *Int J Parasitol* 33, 1553-1559.

Gasser, R.B., Lightowlers, M.W., Obendorf, D.L., Jenkins, D.J., Rickard, M.D., 1988. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of natural *Echinococcus* granulosus infection in dogs using *E. granulosus* protoscolex and oncosphere antigens. *Aust Vet J* 65, 369-373.

Gatti, A., Alvarez, A.R., Araya, D., Mancini, S., Herrero, E., Santillan, G., Larrieu, E., 2007. Ovine echinococcosis I. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay. *Vet Parasitol* 143, 112-121.

Gonzalez, G., Orn, A., Cazzulo, J.J., Gronvik, K.O., 1994. Production and characterization of monoclonal antibodies against the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 40, 389-394.

Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29-36.

Heath, D., Yang, W., Li, T., Xiao, Y., Chen, X., Huang, Y., Yang, Y., Wang, Q., Qiu, J., 2006. Control of hydatidosis. *Parasitol Int* 55 Suppl, S247-252.

Huttner, M., Nakao, M., Wassermann, T., Siefert, L., Boomker, J.D., Dinkel, A., Sako, Y., Mackenstedt, U., Romig, T., Ito, A., 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 38, 861-868.

Irabedra, P., 2009. Epidemiología y control de la equinococcosis quística en el Uruguay, XXIII Congreso Mundial de Hidatidología, Colonia del Sacramento, Uruguay.

Irabedra, P., Roig, C. y cols., 2007. Estimación del impacto económico de la equinococcosis quística en el Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Oficina Regional para América Latina y el Caribe, FAO/RLC.

Irabedra, P., Salvatella, R., 2010. [The Southern Cone Sub-Regional Project on Cystic Echinococcosis Control and Surveillance]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 27, 598-603.

Jenkins, D.J., 2006. *Echinococcus granulosus* in Australia, widespread and doing well! *Parasitol Int* 55 Suppl, S203-206.

Jenkins, D.J., Fraser, A., Bradshaw, H., Craig, P.S., 2000. Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in Australian canids with natural or experimental infection. *J Parasitol* 86, 140-145.

Jenkins, D.J., Gasser, R.B., Zeyhle, E., Romig, T., Macpherson, C.N., 1990. Assessment of a serological test for the detection of *Echinococcus granulosus* infection in dogs in Kenya. *Acta Trop* 47, 245-248.

Kohno, H., Sakai, H., Okamoto, M., Ito, M., Oku, Y. and Kamiya, M., 1995. Development and characterization of murine monoclonal antibodies to *Echinococcus multilocularis* adult worms and its use for the coproantigen detection. *Japanese Journal of Parasitology* 44, 405-412.

Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H., Craig, P.S., 2007. Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Vet Parasitol* 144, 287-292.

Larrieu, E., Zanini, F., 2012. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev Panam Salud Publica* 31, 81-87.

Lonnberg, M., 2002. Membrane-assisted Isoform Immunoassay: Separation and Determination of Protein Isoforms, Center for Surface Biotechnology. Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden, p. 120.

Lopera, L., Moro, P.L., Chavez, A., Montes, G., Gonzales, A., Gilman, R.H., 2003. Field evaluation of a coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine echinococcosis in a rural Andean village in Peru. *Vet Parasitol* 117, 37-42.

Lorenzo, C., Ferreira, H.B., Monteiro, K.M., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., Garcia, H.H., Vasquez, Y., Naquira, C., Sanchez, E., Lorca, M., Contreras, M., Last, J.A., Gonzalez-Sapienza, G.G., 2005. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *Journal of clinical microbiology* 43, 2764-2770.

Malgor, R., Nonaka, N., Basmadjian, I., Sakai, H., Carambula, B., Oku, Y., Carmona, C., Kamiya, M., 1997. Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Parasitol* 27, 1605-1612.

- McManus, D.P., Gray, D.J., Zhang, W., Yang, Y., 2012. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *BMJ* 344, e3866.
- McManus, D.P., Thompson, R.C., 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127 Suppl, S37-51.
- McManus, D.P., Zhang, W., Li, J., Bartley, P.B., 2003. Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295-1304.
- McNeil, B.J., Hanley, J.A., 1984. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Med Decis Making* 4, 137-150.
- Moro, P., Schantz, P.M., 2006. Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitol Int* 55 Suppl, S181-186.
- Moro, P., Schantz, P.M., 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13, 125-133.
- OPS, 2004. Informe del Proyecto Subregional Cono Sur de control y Vigilancia de la Hidatidosis: Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Primera Reunión Constitutiva. Organización Panamericana de la Salud Montevideo.
- Pierangeli, N.B., Soriano, S.V., Roccia, I., Bergagna, H.F., Lazzarini, L.E., Celescinco, A., Kossman, A.V., Saiz, M.S., Basualdo, J.A., 2010. Usefulness and validation of a coproantigen test for dog echinococcosis screening in the consolidation phase of hydatid control in Neuquen, Argentina. *Parasitol Int* 59, 394-399.
- Sage, A.M., Wachira, T.M., Zeyhle, E.E., Weber, E.P., Njoroge, E., Smith, G., 1998. Evaluation of diagnostic ultrasound as a mass screening technique for the detection of hydatid cysts in the liver and lung of sheep and goats. *Int J Parasitol* 28, 349-353.
- Sakai, H., Malgor, R., Basmadjian, I., Gallardo, R., Carmona, C., Sato, H., Oku, Y. and Kamiya, M., 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs. *Japanese Journal of Parasitology* 44, 453-461.

Sanchez Thevenet, P., Jensen, O., Mellado, I., Torrecillas, C., Raso, S., Flores, M.E., Minvielle, M.C., Basualdo, J.A., 2003. Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the Province of Chubut, Argentine Patagonia. *Vet Parasitol* 117, 263-269.

Smyth, J.D., Davies, Z., 1974. In vitro culture of the strobilar state of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results. *Int J Parasitol* 4, 631-644.

Stefanic, S., Shaikenov, B.S., Deplazes, P., Dinkel, A., Torgerson, P.R., Mathis, A., 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. *Parasitol Res* 92, 347-351.

Thompson, R.C., McManus, D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18, 452-457.

Thompson, R.C., McManus, D.P., 2001. Aetiology: parasites and life-cycles in: J. Eckert, M.A.G., F.-X. Meslin and Z.S. Pawłowski (Ed.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*. World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Health Organization., Paris, France.

Torgerson, P.R., 2003. Economic effects of echinococcosis. *Acta Trop* 85, 113-118.

Torgerson, P.R., Deplazes, P., 2009. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends Parasitol* 25, 164-170.

van Dam, G.J., Wichers, J.H., Ferreira, T.M., Ghati, D., van Amerongen, A., Deelder, A.M., 2004. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *J Clin Microbiol* 42, 5458-5461.

Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P.M., Craig, P., Ito, A., 2006. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai–Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitology International* Volume 55, S233–S236.

Zhang, W., Wen, H., Li, J., Lin, R., McManus, D., 2012. Immunology and Immunodiagnosis of cystic Echinococcosis: An Update. *Clinical and Developmental Immunology*.

ANEXO

Algunos de los experimentos realizados y de los resultados obtenidos durante esta tesis fueron publicados en PLOS Neglected Tropical Diseases. Se adjunta la publicación a continuación.

A Monoclonal Antibody-Based Copro-ELISA Kit for Canine Echinococcosis to Support the PAHO Effort for Hydatid Disease Control in South America

Noelia Morel^{1,2}, Gabriel Lassabe², Susana Elola¹, Mauricio Bondad¹, Silvia Herrera³, Carlos Mari⁴, Jerold A. Last⁵, Oscar Jensen⁶, Gualberto Gonzalez-Sapientza^{2*}

1 Comisión Nacional de Zoonosis, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay, **2** Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Montevideo, Uruguay, **3** Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru, **4** Dirección General de Salud Pública, Lima, Peru, **5** Pulmonary/Critical Care Medicine, School of Medicine, University of California Davis, Davis, California, United States of America, **6** Departamento de Investigación en Salud, Chubut, Argentina

Abstract

Cystic echinococcosis is still a major concern in South America. While some regions show advances in the control of the disease, others have among the highest incidence in the world. To reverse this situation the Pan American Health Organization (PAHO) has launched a regional project on cystic echinococcosis control and surveillance. An early concern of the program was the lack of a standardized diagnostic tool to monitor infection in dogs, a key target of control programs. Under this premise, we have developed a new copro-ELISA test after extensive screening of a large panel of monoclonal antibodies (MAbs) and polyclonal sera, which performs with high standards of sensitivity (92.6%) and specificity (86.4%) as established by necropsy diagnosis of dogs. The key component of the test, MAbEg9 has a convenient IgG isotype and reacts with a periodate-resistant epitope found in high molecular weight components of the worm. Time-course analysis of experimentally infected dogs showed that even animals with a very low number of parasites could be detected as early as day 20 post infection. The test was formulated in a ready-to-use kit format with proven stability of each component for a minimum of 3 months at room temperature. This characteristic facilitates its standardized use and shipping to other laboratories, which was demonstrated by the identical results obtained by two different laboratories in Peru and our own laboratory when a large number of field samples were analyzed independently in a blind fashion.

Citation: Morel N, Lassabe G, Elola S, Bondad M, Herrera S, et al. (2013) A Monoclonal Antibody-Based Copro-ELISA Kit for Canine Echinococcosis to Support the PAHO Effort for Hydatid Disease Control in South America. PLoS Negl Trop Dis 7(1): e1967. doi:10.1371/journal.pntd.0001967

Editor: David Duncan Heath, Agresearch NZ Ltd, New Zealand

Received: June 11, 2012; **Accepted:** October 30, 2012; **Published:** January 10, 2013

Copyright: © 2013 Morel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by ANII (<http://www.anii.org.uy>) FSS 2302 with contributions by the Comisión Nacional de Zoonosis, MSP, Uruguay, PAHO, and NIH Fogarty International Center Grant TW05718. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ggonzal@fq.edu.uy

Introduction

Cystic echinococcosis, caused by infections with *Echinococcus granulosus*, is one of the main zoonoses related to dogs and is affecting most parts of the globe [1]. Different control programs aimed to decrease the impact of the disease have been instrumented in many countries. Although the rate of success has been highly variable, it has become evident that a tight control of dog infections is the key element to arrest the life cycle of the parasite. This has created a demand for reliable diagnostic tests for canine echinococcosis as a tool to obtain epidemiological baseline information and help in the surveillance of hydatid control [2–5]. However, accurate diagnosis of dog infection is complex and challenging, and other than careful necropsy of dogs, there is no perfect gold standard [6].

Parasitological examination of eggs is unsafe and not very useful because *E. granulosus* are morphologically difficult to distinguish from other taeniae eggs, and appear late (after the first month) of infection. Traditionally, screening of dogs for *E. granulosus* has been done by arecoline purgation, followed by examination of the purge for parasites by trained personnel. The method is highly specific,

but it is tedious, biohazardous, unpopular among dog owners, and its sensitivity is modest, particularly when the parasite burden is low and bowel evacuation is incomplete [7,8]. As an alternative, different laboratory tests for ante-mortem diagnosis of canine echinococcosis have been developed, including detection of antibodies in serum, Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of parasite DNA and immunological detection of antigens (coproantigens) in fecal samples. Different studies have been carried out to explore the potential use of dog serology to diagnose the disease. However, the systemic immune response to the parasite is poor and consequently the sensitivity attained is also low [4]. Parasite DNA excreted with eggs, proglottids or cells has been detected in fecal specimens by PCR amplification using specific primers derived from mitochondrial DNA [9,10]. The method has provided the high specificity of PCR, but due to the presence of inhibitors the DNA extraction procedure is cumbersome and the technique requires expensive reagents and specialized laboratories [11]. In addition, the pre-patent period of the infection, when there is no egg production, is a critical time-window that challenges the sensitivity of the test. Introduced at the beginning of the 1990's, the detection of parasite antigens in fecal samples by

Author Summary

Cystic echinococcosis, caused by infection with the larval stage of the *Echinococcus granulosus* tapeworm, is a life-threatening zoonosis of worldwide distribution. The adult worm parasitizes the small intestine of dogs, which become infected after eating offal of an animal contaminated with the parasite, and releases eggs into the environment that can be accidentally ingested by domestic animals or humans, maintaining the life cycle of the parasite. Deworming of dogs is a major component of control programs, and simple and reliable methods are needed to monitor the base-line infection in the canine population. The lack of these tests was recognized as a major obstacle to the PAHO effort to control the disease in South America. This paper describes the development of a diagnostic assay that detects parasite antigens in dog feces. The key component is a monoclonal antibody carefully selected to attain high levels of sensitivity and specificity, which were established with a large panel of field fecal samples obtained from animals diagnosed by necropsy. Several aspects of the long-term stability of the test were optimized to facilitate its shelf-life and transference to other laboratories.

immunoassays became a widely accepted diagnostic test [12,13]. The major attractive features of the method include its simplicity, the possibility of detecting parasite components even in the pre-patent period, and the fact that the target antigens (coproantigens) are highly stable. Samples can be collected in 1% of 40% formaldehyde and kept at room temperature for extended periods of time, facilitating the logistics of large-scale studies in remote areas [7,14–16]. The study of a large group of infected dogs necropsied at the end of the pre-patent period demonstrated a superior sensitivity for the copro-ELISA (83%), when compared to copro-PCR (26%) or arecoline purgation (43 and 77% after one or two doses, respectively). Most failures to detect positive infected dogs occurred when the number of worms was less than one hundred [5].

Despite its proven utility and the numerous reports of copro-ELISA developments, the availability of commercial or home-made tests is often a major obstacle to the implementation and evaluation of echinococcosis control programs. The need to overcome this difficulty has been recognized as an early goal of the Southern Cone Sub-Regional Project on Cystic Echinococcosis Control and Surveillance: Argentina, Brazil, Chile and Uruguay, and PAHO (Pan American Health Organization), a joint and collaborative effort to battle the disease in the region. In this framework, we have developed an immunoassay for *E. granulosus* copro-antigen detection under the premise that in addition to performing with high standards of proven sensitivity and specificity, it had to be robust, standardized and developed in a kit format to be available for its use in regional programs for the control of the disease.

Materials and Methods

Ethics statements

All activities involving animals were performed with special care to establish high standards of biosafety and assure animal welfare. All protocols were performed according to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, (CIOMS) and were approved by the Comisión Nacional de

Zoonosis and the Research Department of the Ministry of Health of the province of Chubut.

Experimental and field animals

Nineteen adult dogs, of mixed breeds and sex, were vaccinated against distemper encephalomyelitis, parvovirus, rabies, leptospirosis, hepatitis and coronavirus (Merial, France), treated orally with praziquantel 5 mg/kg, pyrantel embonate 15 mg/kg and febantel 15 mg/kg (Disper, Uruguay) to eliminate worm parasites, and topically with a solution of fipronil and methoprene (Merial) to arrest the development of ectoparasites. Dogs were purchased from local suppliers and maintained on commercial dog food and water *ad libitum*. Nineteen fecal samples (N1–N19), corresponding to non-infected dogs, were collected two days after deworming. Then, ten dogs (identified as P1–P10) were infected orally with 5,000–150,000 viable (>80%) protoscoleces from ovine fertile hydatid cysts. Two additional dogs (identified as Th1 and Th2) were infected orally with 1 and 3 larvae of *Taenia hydatigena*, respectively. Parasite material was obtained from sheep slaughter in local abattoirs in Paysandú, Uruguay. Stool samples from each dog were collected daily during the experimental period, at the end which (27–30 days post-infection (dpi)), the animals infected with *E. granulosus* were euthanized for necropsy diagnosis by intramuscular injection of acepromazine maleate (0.11 mg/kg) and ketamine (20 mg/kg) (Laboratorio Holliday, Argentina), following by an intravenous overdose of sodium thiopental (Laboratorio Crusur Vet, Uruguay). The dogs infected with *T. hydatigena* were purged at 70 dpi with arecoline bromhydrate (Crescent Chemical Co. Inc., New York, USA), following by treatment with anti-parasitic drugs. Three additional samples from dogs experimentally infected with *E. granulosus* (26 dpi) and two with *T. hydatigena* (about 55 dpi) from previous studies [14,16] were obtained as a kind gift from Dr. Carlos Carmona. In addition, 85 unwanted dogs from the province of Chubut, Argentina, and 11 unwanted dogs from Junin, Peru, were euthanized following the procedure described above, and the small intestines were removed post mortem, opened longitudinally and examined directly for the presence of parasites following the recommendations of the WHO/OIE [17]. All activities were performed following the local legislation and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (<http://www.cioms.ch/>).

Preparation of fecal samples

Stool samples from each dog were collected daily during the experimental infection period, or from the rectum upon necropsy, in 1% of 40% formaldehyde, phosphate buffered saline (PBS), in a 1:4 v/v ratio. Samples were vigorously shaken to obtain homogeneous slurries, and were then boiled for 20 min in a water bath, to eliminate their biological risks. After centrifugation for 10 min at 2,200 × g the supernatants were aliquoted and kept frozen at −20°C until used.

Parasite antigens

The parasite antigens were prepared essentially as described by Casaravilla et al. [16]. *E. granulosus* worms were collected from the small intestine of experimentally infected dogs by incubation of small pieces of the open gut in sterile Hank's balanced salt solution (Sigma, San Louis). The recovered worms were counted and extensively washed in Hank's solution containing 200 mg/L of gentamicin, and incubated in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with glucose (4 g/L), penicillin (10⁵ IU/L), streptomycin (100 mg/L) and amphotericin B (250 µg/L) (Sigma). The supernatant was collected every 8 h for two days and the excretion/secretion antigens (E/S) concentrated 100× using an Amicon ultrafiltration

unit with an YM-10 membrane (Millipore, USA), followed by dialysis against PBS. *E. granulosus* somatic antigen (Sm) was obtained by sonication of adult parasites in PBS supplemented with ULTRA Protease Inhibitor Tablets (Roche, Indianapolis) on ice, centrifugation and filtration (0.22 µm). Antigens from *T. hydatigena* were similarly prepared. Protein content was determined using a BCA kit (Pierce, Rockford, Illinois).

Polyclonal antibody production

To prepare polyclonal antibodies, 100 µg of Sm or E/S antigens were dissolved in 250 µl of PBS and vigorously mixed with 250 µl of Freund's Complete Adjuvant (Pierce, Illinois) to form a thick emulsion. This emulsion was then injected subcutaneously into several points on the back of New Zealand white rabbits. After 4 and 8 weeks, the animals were immunized intramuscularly with additional doses of 100 µg of antigen emulsified in Freund's Incomplete Adjuvant. Ten days after the final booster the animals were bled. The IgG fraction was prepared by precipitation of the sera with ammonium sulfate, affinity purified on protein G agarose (Amersham, Uppsala, Sweden), and kept at −20°C until used.

Selection of MAb CPR39

For monoclonal antibody (MAb) preparation, Balb/c mice were primed intraperitoneally with 40 µg of *E. granulosus* Sm or E/S antigen in Freund's complete adjuvant, and boosted after 3 and 6 weeks with the corresponding antigen using Freund's incomplete adjuvant. Three days after the last booster mice were sacrificed and the splenocytes fused with SP2/0 cells using standard procedures. Cultures producing MAbs reactive with the corresponding antigen were selected by ELISA. We initially performed a fusion experiment using mice immunized with alternate doses of E/S and Sm antigens, and additional selection in a sandwich format using fecal samples. MAb CPR39 was selected due to its convenient isotype and performance.

Selection of MAb Eg9

Several fusion experiments were performed to produce a large panel of monoclonal antibodies. The screening of the monoclonal antibodies was initially performed as described before, and then each of the double-positive supernatants (13 clones) was tested in a sandwich format in combination with the different polyclonal antibodies. However, this time instead of using fecal samples from heavily infected dogs, each supernatant was tested against the following: i) a negative sample from a non-infected dog, ii) a sample collected from a low-burden dog at 28 dpi (dog P9, 74 worms), iii) a sample from a heavily infected dog taken at an early stage (10 dpi) of the pre-patent period (dog P8, 3459 worms), and iv) a sample from dog Th2 taken at 56 dpi that was positive in the CPR39 copro-ELISA. Out of this complex screening clone MAbEg9, in combination with polyclonal antibody PAbC4 (prepared from a rabbit immunized with E/S), was chosen because this antibody pair produced high signals with samples (ii) and (iii), and low readings with samples (i) and (iv).

SDS-PAGE and Western blot

Parasite preparations were resolved by SDS-PAGE 12% under reducing conditions and then transferred onto nitrocellulose sheets (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The nitrocellulose was blocked with 3% non-fat milk powder in PBS 1 h at 37°C and was incubated for 1 h at 37°C with a 1:500 dilution of the rabbit antisera in PBS containing 0.05% of tween 20 (PBS-T), 3% non-fat milk, or directly with the culture supernatants of the MAbs

antibodies. The membranes were then incubated for 1 h at 37°C with alkaline phosphatase-conjugated to anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Pierce) (diluted 1/2500). After extensive washing, a substrate solution containing 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine salt (BCIP) and Nitro-Blue Tetrazolium Chloride (NBT) was added according to the manufacturer's instructions (Sigma).

Copro-ELISA assay

Five µg/mL of polyclonal IgG (100 µL/well) (PAb CG10 or PAbC4 for the MAb CPR39 or MAbEg9 copro-ELISA, respectively) was dispensed into microtitration plates (Greiner, Germany) and incubated overnight at 4°C. The plates were then blocked with 5% non-fat milk (PBS) and washed with PBS-T. Alternatively, the plates were further treated with PBS, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 5% sucrose, 0.02% sodium azide, flapped repeatedly against adsorbent paper, dried in a 40% relative humidity chamber for 4 h, and kept in sealed aluminum foil bags containing adsorbent packets (Sigma) until used. Samples were analyzed in triplicates, after a 1:2 dilution in PBS; 100 µL/well were incubated for 1 h at room temperature, the wells washed and loaded (100 µL/well) with a 1:50 dilution of the MAb supernatants and incubated for 1 h at room temperature. Finally, the wells were incubated (1 h) with a 1:5000 dilution (PBS-T) of a peroxidase conjugated rabbit polyclonal antibody to mouse IgG, carefully washed and developed with 100 µL/well of the substrate solution (0.4 mL of a 6 mg/mL DMSO solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 0.1 mL of 1% H₂O₂ in water in a total of 25 mL of 0.1 M citrate acetate buffer pH 5.5) and incubated for 15 min at room temperature with shaking. The enzymatic reaction was stopped after 15–20 min by the addition of 50 µL of 2 M H₂SO₄ and the absorbance at 450–600 nm was read in a microtiter plate reader (Multiskan MS, Labsystems). The cut-off for the assay was established by Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis [18] using a confidence level of 95% and the SPSS 10.0 software package (SPSS Inc. Illinois, USA) for calculations.

Results and Discussion

Parasite extraction and antigen preparation

Upon necropsy at 27–30 dpi, 9 of the experimentally infected dogs P1–P10 dogs harbored *E. granulosus* worms. The number of worms recovered from each dog varied widely, from 74 to 8,500, and showed no correlation with the initial number of proto-scoleces used for infection. No other parasites were observed in addition to the *E. granulosus* worms. Adult worms (typically less than 1 m long) were recovered from dogs Th1 and Th2 infected with *T. hydatigena*. After careful washing, the recovered parasites were kept in culture to prepare excretion/secretion antigens, or were sonicated as described to obtain somatic antigens. The SDS-PAGE analysis of these antigens is shown in **figure 1A**; a proto-scolecex extract was also included as a reference antigen. All preparations possessed a complex composition and the SDS-PAGE profile did not reveal any obvious similarities among the individual components of the different preparation.

Characterization of antibodies to worm antigens

Initially, the reactivity of polyclonal antibody PAbCGB10 raised against the Sm antigen was characterized, **figure 1B**. There was a strong response to a large number of components of the immunizing antigen, as well as to high molecular weight components of EgE/S and *T. hydatigena*. Destruction of sugar epitopes by periodate treatment significantly decreased the

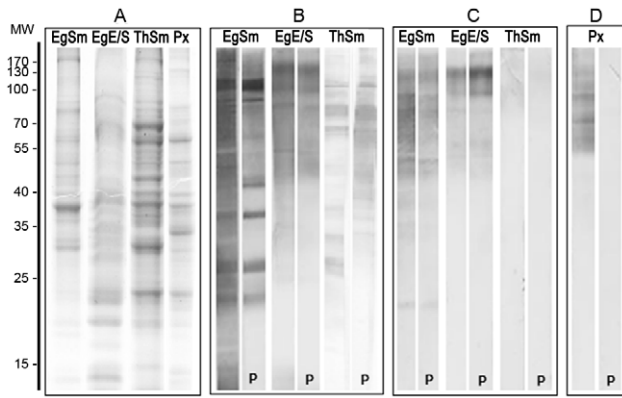


Figure 1. Analysis of parasite antigens by SDS-PAGE and immunoblot. A) Coomassie stained 12% SDS-PAGE of *E. granulosus* antigens: E/S, excretion/secretion antigen; Sm, somatic antigen; Px, protoescoleces sonicate; and *T. hydatigena* somatic antigens: ThSm. Molecular markers in kDa are shown on the left. B–D) Immunoblot probed with polyclonal rabbit antibody PAbCGB10 (B), MAbEg9 (C) or E492/G1 (D). The nitrocellulose strips marked with a “P” were pre-treated with periodate to modify the sugar epitopes.
doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g001

reactivity of this antibody with the somatic antigen, as has been observed before [2,19], but had little effect in the case of the E/S preparation. The marked cross-reactivity of the polyclonal antibodies with E/S components of *T. hydatigena* evidences how difficult it is to obtain a specific assay using these antibodies as reagents. For that reason we concentrated our efforts in the preparation and selection of monoclonal antibodies. After initial screening against E/S and Sm and further selection using PAb CGB10 for capture and the hybridoma supernatants for detection, four clones providing the best signal/noise ratios with fecal samples were selected. Among these, clone MAbCPR39, secreting an IgG2b, was chosen.

MAb CPR39 copro-ELISA

This ELISA was used to examine fecal samples obtained at the end of the infection, days 27–30 for *E. granulosus* or at selected dpi (highest cross-reactivity) for *T. hydatigena* (figure 2). The assay performed with negligible reactivity with samples from non-infected dogs and moderate cross-reactivity with *T. hydatigena* infected animals. All *E. granulosus* infected dogs were positive, however, the readouts of the samples corresponding to dogs with small parasite burdens were significantly higher, but too close to the mean value of the negative dogs to give unequivocal results. The assay was then used to study the time course of coproantigen excretion during the experimental infection period (figure 3). Using a cut-off derived from the analysis of field samples (see below), we found that dogs with high parasite burdens became positive after two weeks, and in spite of some fluctuations remained so thereafter. On the other hand, dogs with less than 200 worms at necropsy, presented low readouts throughout the experiment, becoming positives only at the end of the experimental infection. Along the time course of the examined period, the dogs harboring *T. hydatigena* worms presented very low values (below the cut-off), showing positive values only in very few days after 40 dpi (not shown).

MAb EG9 copro-ELISA

Due to the limited sensitivity of the CPR39 copro-ELISA, new antibodies were prepared. The best combination resulted when PAb C4 was used as capture antibody in combination with MAb Eg9. The reactivity of PAbC4 with different parasite antigens in western blot was similar to that of PAbCGB10 (figure 1B) and it is not shown. MAbEg9 is an IgG; its reactivity with different parasite extracts is displayed in figure 1C. The antibody reacted with a large number of the EgSm bands, mostly in the middle to high molecular weight range. Two components of 100 and 160 kDa are the most prominent immunoreactive bands of the E/S antigens, which appear to be also present in the Sm preparation. The cross-reactivity with Th E/S antigens was negligible (as was also the case with protoescoleces antigens, not shown). Treatment with periodate had no effect upon the reactivity of MAbEg9 with any of the

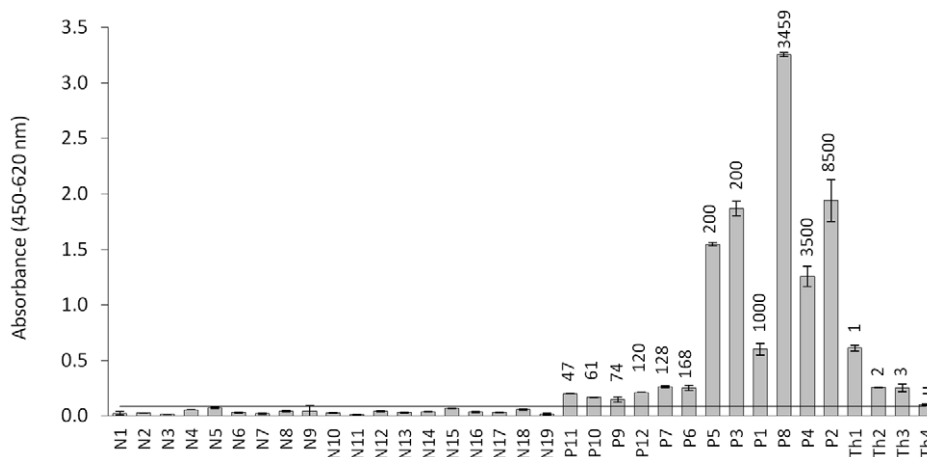


Figure 2. Analysis of coproantigens from non-infected dogs, and *E. granulosus* and *T. hydatigena* experimentally infected animals by CPR39 copro-ELISA. N1–N19, fecal samples taken from non-infected dogs; P1–P12, fecal samples taken from *E. granulosus* infected dogs at the end of the pre-patency period; Th1–Th4, fecal samples collected from *T. hydatigena* infected dogs, at 72, 61, 56, and 40 dpi, respectively, corresponding to the highest values of cross-reactivity during the infection period for each dog. The number of worms recovered from each dog is indicated on top of the columns (u = unknown). The black horizontal line represents the cut-off = average of N-samples + 3 standard deviations.
doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g002

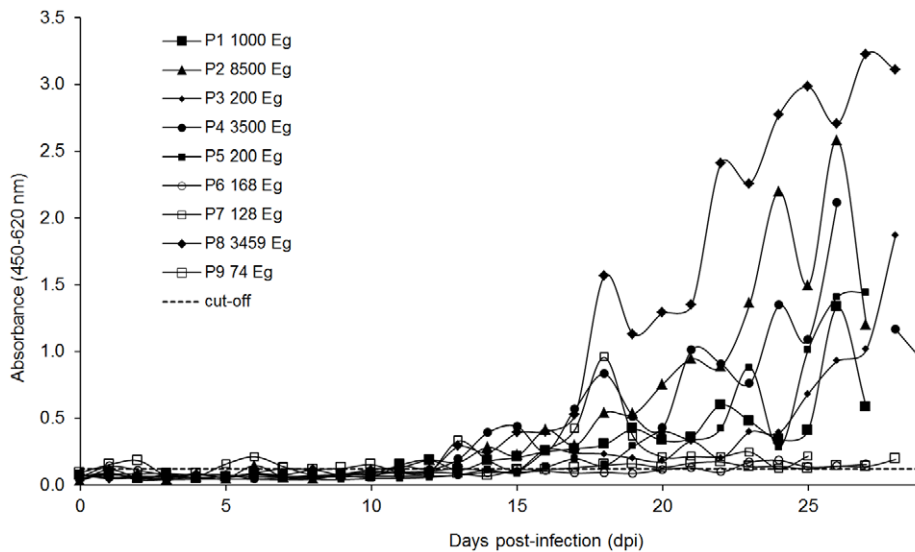


Figure 3. Time course of coproantigen excretion during the experimental infection of dogs assessed with the CPR39 copro-ELISA. The number of parasites at necropsy is shown in the legend; dogs with less than 200 parasites are denoted by open symbols. The dotted line represents the cut-off established by analyzing field samples as described below. doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g003

antigens, which was unexpected because previous studies have shown that the sugar epitopes have a major role in the immune response against *E. granulosus* coproantigens [2,19]. To rule out technical artifacts, the efficacy of the periodate treatment was tested in parallel using the monoclonal antibody E492/G1 that defines a sugar epitope highly expressed in *E. granulosus* proto-scolecex preparations [20], **figure 1D**.

When the experimentally-infected dog samples were analyzed with the new assay, it was evident that the Eg9 copro-ELISA produced stronger signals with samples from dogs with small numbers of worms, allowing a better discrimination between non-infected and infected dogs (**figure 4**). This is an important improvement because most of the reported tests failed to detect these kind of samples. Cross-reactivity with *T. hydatigena* coproanti-

gens did not seem to be a major problem when the time course of coproantigen excretion was studied with the Eg9 copro-ELISA (**figure 5**). Using the cut-off estimated by the receiver operating characteristic (ROC) curves from the analysis of field samples (see below), only on very few occasions and after 40 dpi were some of the samples from *T. hydatigena* infected dogs positive. The Eg9 copro-ELISA allowed an earlier detection of infected dogs. Animals with 200 or more parasites became positive between 12–15 dpi and by dpi 20 all infected dogs were positives and remained so thereafter. Curiously, coproantigens in dogs P7 and P8 samples could be detected very early. This is more remarkable in the case of dog P7 that harbored a rather small number of worms (128) at necropsy, and may be the result of the spontaneous expulsion of worms a few days after infection.

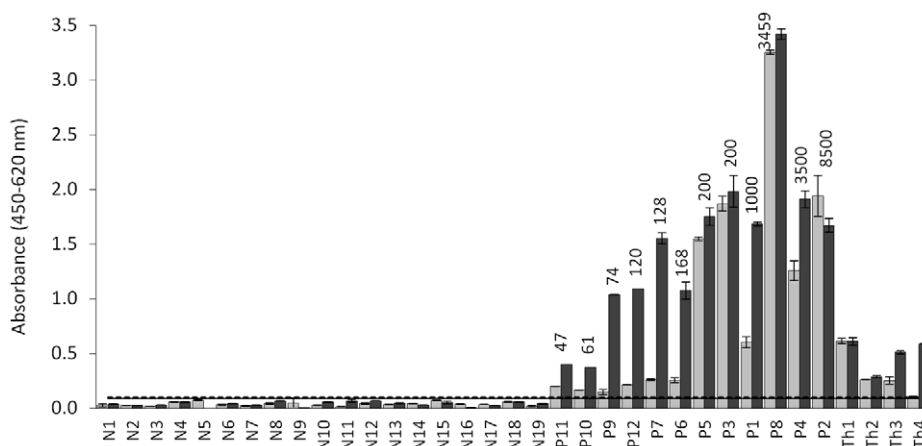


Figure 4. Analysis of coproantigens from non-infected dogs and *E. granulosus* and *T. hydatigena* experimentally infected animals by Eg9 copro-ELISA. Light gray bars, MAbCPR39 assay; gray bars, MAbEg9 assay (the results of the MAbCPR39 copro-ELISA are included for comparison). N1–N19, samples taken from non-infected dogs; P1–P12, samples taken at the end of the pre-patency period; Th1–Th4, fecal samples collected from *T. hydatigena* infected dogs, at 72, 61, 56, and 40 dpi, respectively, corresponding to the highest values of cross-reactivity during the infection period for each dog. The number of worms recovered from each dog is indicated on the columns (u = unknown). The black horizontal line represents the cut-off = average of N-samples (MAbEg9) + 3 standard deviations. doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g004

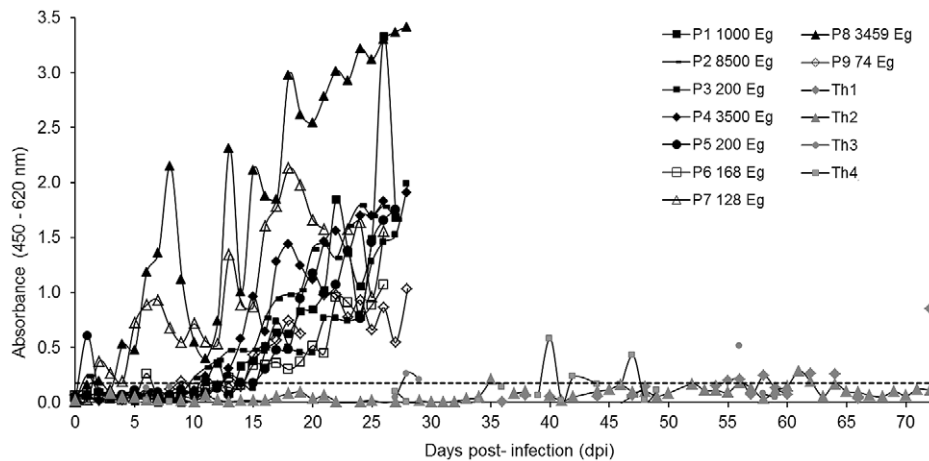


Figure 5. Time course of coproantigen excretion during the experimental infection of dogs measured by Eg9 copro-ELISA. Dogs infected with *E. granulosus* are shown in black, open symbols are used to represent dogs with less than 200 parasites at necropsy. The *T. hydatigena* infected dogs are shown in gray. The dotted line represents the cut-off established by the analysis of field samples as described below.
doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g005

Analysis of field samples

The cut-off and cross-reactivity of the assays were evaluated with field samples collected from 96 unwanted dogs in the provinces of Chubut, Argentina and Junin, Peru. Upon necropsy, 9 of 85 dogs from Chubut, and 6 of 11 dogs from Junin were positive for *E. granulosus*, 48 were infected with other parasites and 33 were found negative, **table 1**. Fecal samples from these dogs were tested using the CPR39 and Eg9 copro-ELISAs and the cut-off selected from receiver operating characteristic (ROC) curves [18] to have a convenient balance between sensitivity and specificity as follows: CPR39 ELISA = 0.224 AU and Eg9 ELISA = 0.340 AU. Using these values, the sensitivity of the tests were 80.0 and 86.6% respectively, which is in agreement with the results obtained with the experimental infection of dogs, **figure 4**. The specificity of the Eg9 test was also superior 86.4% versus 82.7% for the CPR39 ELISA. In addition, the CPR39 test produced readings close to the cut-off for an important number of samples, **figure 6**, which may be problematic for the use of a cut-off internal calibrator, because small inter-assay variations in the reading of the calibrator may have an important effect upon the number of samples that are classified in either category. Actually, if samples that fall between $\pm 10\%$ of the cut-off are considered as undetermined (a common practice), none of the samples analyzed with the Eg9 test would fall in this category, while four of the samples analyzed with the CPR39 would. While it was not possible to obtain an exact counting of parasites in the dogs from the province of Chubut, this was feasible in the case of the animals necropsied in Junin. Although most dogs had a large number of worms, two of them did not, and these two dogs were exhaustively examined. We found only 9 *E. granulosus* and 2 *Ascaris lumbricoides*, and 47 *E. granulosus* and very few *Dipylidium caninum* worms in the first and second dogs, respectively. Interestingly, the average absorbance readings of the fecal samples obtained from these animal were 1.16 and 2.99 AU, which represent strong positive results, indicating the sensitivity of the test and confirming the capacity of the assay to detect small numbers of parasites that had been observed in the experimentally infected dogs. In this regard, when the *E. granulosus* positive dogs from the experimental infection are included, the overall sensitivity of the test rises to 92.6%. Despite the fact that MAbEg9 was selected for its reduced cross-reactivity with the ThSm antigen, most of its cross-reactivity

was against dogs infected with *T. spp* (mostly *hydatigena*) alone or together with other parasites. Only one dog infected with *T. canis* (1.44 AU) and one of the non-infected dogs (0.694 AU) from the province of Chubut were classified as positive with the Eg9 ELISA, **figure 6**. The relatively high readings of these two samples are unexpected. Based on the results of the experimental infection of dogs and the fact that all other samples (19) from dogs harboring *T. canis* alone or together with *Dipylidium caninum* showed very low readings, a misdiagnosis at necropsy can not be discarded. It is worth noting that cross-reactivity was essentially against *Taenia*. Despite the fact that we could not identify to species all field samples, the great majority of samples from Chubut and all from Junin corresponded to *T. hydatigena*; hence most false positive results will be related to dogs eating offal.

Table 1. Analysis of field samples by necropsy and copro ELISA.

Necropsy results	Total	CPR39+	Eg9+
Eg (and others)	15	12	13
Tsp	8	3	3
Tsp To Dc	3	1	3
Tsp To	6	4	3
To	17	1	1
Dc	10	2	0
To Dc	3	0	0
Tt	1	0	0
Negatives	33	3	1
Sensitivity		80.0%	86.6%
Specificity		82.7%	86.4%

Eg: *E. granulosus*, Tsp: *Taenia spp*, Dc: *Dipylidium caninum*, To: *Toxocara canis*, Tt: *Trichuris trichura*. CPR39+ and Eg9+ indicate samples classified as positive by the respective tests.

doi:10.1371/journal.pntd.0001967.t001

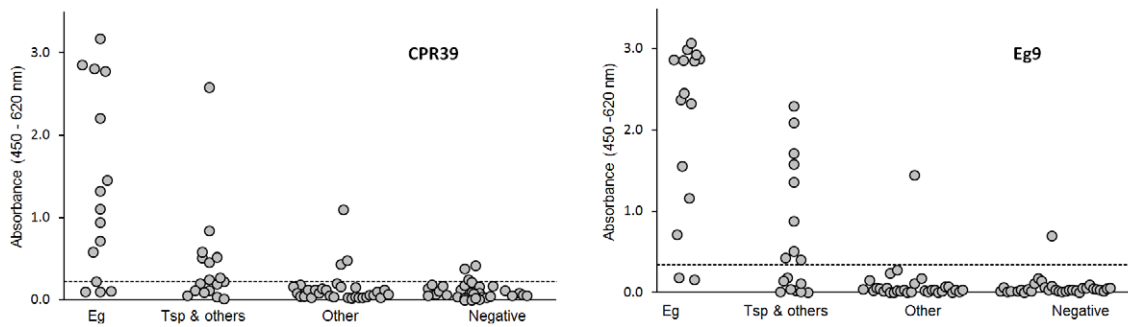


Figure 6. Analysis of field samples with the CPR39 and Eg9 ELISAs. Fecal samples collected from field dogs were grouped according to the parasites they harbored as follows: Eg, *E. granulosus*; Tsp & other, *Taenia spp* plus other helminths; Other, other helminths; Negative, dogs with no helminths. All values were determined in triplicates. doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g006

Development of the ELISA test in a kit format and inter-laboratory analysis of blind samples

The Eg9 test was then formulated in a kit format to facilitate its use and transference to other laboratories. Initially, we studied different conditions for coating and drying the plates and found that using sugars as additives during drying have the best effect on the stability of the capture antibody. Trehalose and sucrose showed the best results and the latter was chosen because of its much lower cost. **Figure 7A** shows that dried plates showed similar capacity as fresh ones to discriminate between weak positive and negative samples over a one year period of storage at 4°C. Similar results were obtained after 2 years of storage (not shown). To set up the value of the cut-off an internal standard was prepared by adjusting the dilution of the *E. granulosus* Sm antigen in order to produce a readout equal to the value of the cut-off. The stability of this cut-off calibrator solution and other components of the assay (in their ready-to-use dilution) were tested using different diluent buffers at 4°C, room temperature, and 37°C, and some representative results are shown in **figure 7B–D**. Different formulations of the calibrator solution were stable over a 6 month

period, even at 37°C; only the results for the Sm antigen diluted in PBS, 5% glycerol, 0.1% Kathon (Dow Chemicals, Midland, Michigan) are shown. The reactivity of MAbs Eg9 started to diminish after a few days at 37°C, but was highly stable over the 6 month period at 4°C (not shown) or at room temperature, **figure 7C**. The most critical component was the secondary antibody. For several different formulations (only two shown in **figure 7D**) all of them rapidly lost the enzymatic activity at 37°C, but using PBS, 0.1% BSA, 0.1% Kathon, 0.1 mM TMB, the conjugate remained stable for up to 150 days at room temperature (or 4°C, not shown). Overall, we can conclude that even at room temperature the kit has a safe shelf life of 3 months, which can surely be extended upon refrigeration, which is a convenient advantage for the shipment and use of the kit in remote places. Due to the availability of commercial ready-to-use TMB substrate solutions, the preparation of this kit component was not pursued in this study. In case of high demand of the kit, it will be necessary to prepare new PAb. In our experience, this is a critical component of the test, but we have selected similarly performing PABs from a panel of 3 to 4 immunized rabbits, after initial selection with fecal

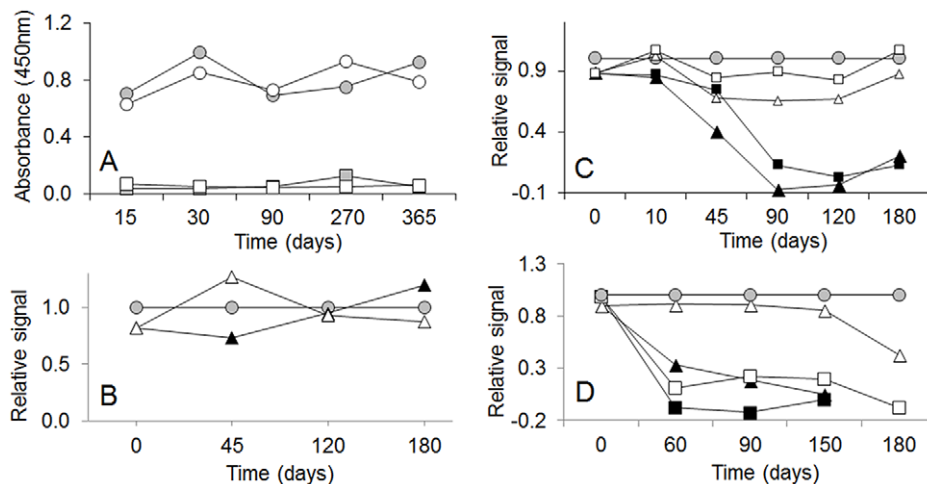


Figure 7. Time-course stability of the copro-ELISA kit components. A) Dried or freshly-coated plates (white and gray symbols, respectively) were tested at different time points by assaying a set of 3 weak-positive and 3 negative samples (average = circles and squares, respectively). B–D) Fresh solutions of the calibrator were tested in triplicate at different time points, using fresh (grey circles) or stored dilutions of the kit reagents kept at room temperature (white) or 37°C (black symbols). All values were normalized with regard to the value obtained with the fresh reagent. B) Stability of the calibrator: triangles, PBS, 5% glycerol, 0.1% Kathon. C) MAb Eg9 stability: squares, PBS-T; triangles, PBS-T, 0.1% Kathon. D) Stability of the peroxidase anti-mouse IgG antibody: squares, PBS, 0.1% BSA; triangles, PBS, 0.1% BSA, 0.1% Kathon, 0.1 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). doi:10.1371/journal.pntd.0001967.g007

samples from dogs harboring low number of *E. granulosus* parasites and counter selection with samples from *T. hydatigena* infected dogs.

The reproducibility of the results obtained with the copro-ELISA kit and the feasibility of its transference were demonstrated by the analysis of blind samples. To this end, 52 fecal samples collected in the province of Junin, Peru were processed as described, and aliquots were distributed to two laboratories (INS and DIGESA) in Lima, Peru, where the copro-ELISA kit had been transferred, and to our laboratory in Uruguay (Facultad de Química). The samples were independently analyzed by the three laboratories and classified as positive, negative or uncertain if their readout fell within the calibrator absorbance reading $\pm 10\%$ range. Twenty four samples were positive, indicating a prevalence of 46.1% in the studied areas (Canchaylo and Jauja). The kit performed with excellent reproducibility and all individual samples were equally classified by the three laboratories with the exception of two of the samples with readings close to the cut-off, one of them categorized as negative by two of the labs and uncertain by the third one, and another sample classified as (weak) positive by two of the labs and uncertain by the remaining one.

Concluding Remarks

Two tests were developed and the difference in their performance highlights the importance that careful selection of antibody pairs has to attain a high standard of sensitivity and specificity. The Eg9 test performed with high sensitivity (92.6%) and good specificity (86.4%). These parameters are closely similar to previously reported values for other tests. However, it is very important to keep in mind that the only trustworthy comparison of tests is that obtained with a common panel of samples assayed under identical conditions, which highlights the need of inter-laboratory studies to compare the performance of existing test.

References

- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB (2003) Echinococcosis. *Lancet* 362: 1295–1304.
- Elayoubi FA, Fraser A, Jenkins DJ, Craig PS (2003) Partial characterisation of carbohydrate-rich *Echinococcus granulosus* coproantigens. *Int J Parasitol* 33: 1553–1559.
- Heath D, Yang W, Li T, Xiao Y, Chen X, et al. (2006) Control of hydatidosis. *Parasitol Int* 55 Suppl: S247–S252.
- Craig PS, Rogan MT, Campos-Ponce M (2003) Echinococcosis: disease, detection and transmission. *Parasitology* 127 Suppl: S5–20.
- Lahmar S, Boufana B, Bradshaw H, Craig PS (2007) Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Vet Parasitol* 144: 287–292.
- Torgerson PR, Deplazes P (2009) Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends Parasitol* 25: 164–170.
- Allan JC, Craig PS (2006) Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. *Parasitol Int* 55 Suppl: S75–80.
- Jenkins DJ, Fraser A, Bradshaw H, Craig PS (2000) Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in Australian canids with natural or experimental infection. *J Parasitol* 86: 140–145.
- Abbasi I, Branzburg A, Campos-Ponce M, Abdel Hafez SK, Raoul F, et al. (2003) Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg* 69: 324–330.
- Stefanic S, Shaikenov BS, Deplazes P, Dinkel A, Torgerson PR, et al. (2004) Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (“sheep strain”) in naturally infected dogs. *Parasitol Res* 92: 347–351.
- Mathis A, Deplazes P (2006) Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol Int* 55 Suppl: S87–90.
- Allan JC, Craig PS, Garcia Noval J, Mencos F, Liu D, et al. (1992) Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology* 104 (Pt 2): 347–356.
- Deplazes P, Gottstein B, Eckert J, Jenkins DJ, Ewald D, et al. (1992) Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol Res* 78: 303–308.
- Malgor R, Nonaka N, Basmadjian I, Sakai H, Carambula B, et al. (1997) Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Parasitol* 27: 1605–1612.
- Jenkins DJ, McKinlay A, Duolong HE, Bradshaw H, Craig PS (2006) Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in faeces from naturally infected rural domestic dogs in south eastern Australia. *Aust Vet J* 84: 12–16.
- Casaravilla C, Malgor R, Rossi A, Sakai H, Nonaka N, et al. (2005) Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection. *Parasitol Int* 54: 43–49.
- WHO/OIE (2001) Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern; Eckert J, Gemmel MA, Meslin F, Paulowski Z, editors.
- Hanley JA, McNeil BJ (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143: 29–36.
- Elayoubi FA, Craig PS (2004) *Echinococcus granulosus* coproantigens: chromatographic fractionation and characterization. *Parasitology* 128: 455–465.
- Dematteis S, Piroto F, Marques J, Nieto A, Orn A, et al. (2001) Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice. *Parasite Immunol* 23: 1–9.

The test cross-reactivity was low, and in addition, since it was basically restricted to *T. hydatigena*, most false positive results will still indicate access of dogs to offal. A major contribution of our study is the use of a well-characterized MAb that assures availability and batch-to-batch reproducibility, as well as the formulation of the assay in a kit format with extended shelf life. The Eg9 test is being shared with other control programs in the region and we hope that it will help to monitor the progress of control programs and standardize the epidemiological baseline information in the region.

Supporting Information

Checklist S1 STARD Checklist for the Eg9 copro antigen test.
(DOC)

Flowchart S1 STARD flow chart detailing the method used to assess the diagnostic performance of the Eg9 copro antigen test.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr. Carmona and Dr. Cecilia Casaravilla for their advice and provision of samples. We are also grateful to the medical veterinarians and staff of the Comisión Nacional de Zoonosis, Uruguay, for help with the experimental infection of dogs. The personnel and medical veterinarians from the Dirección Regional de Salud de Huancaayo, Peru, are also acknowledged for their help with the pilot study of dog infection.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NM GL OJ GGS. Performed the experiments: NM GL SE MB SH CM OJ. Analyzed the data: NM GGS. Wrote the paper: NM JAL GGS.