

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“VALIDACION DE LA PRUEBA DEL KIT ELISA PARA EL
DIAGNOSTICO DE HIDATIDOSIS BOVINA”**

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. FERNANDO ZAVALA QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

Validación de la Prueba del Kit ELISA para el Diagnostico de Hidatidosis Bovina

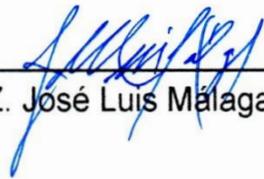
PRESENTADO POR:

Bach. FERNANDO ZAVALETA QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



PRESIDENTE:


M.V.Z. José Luis Málaga Pumarica

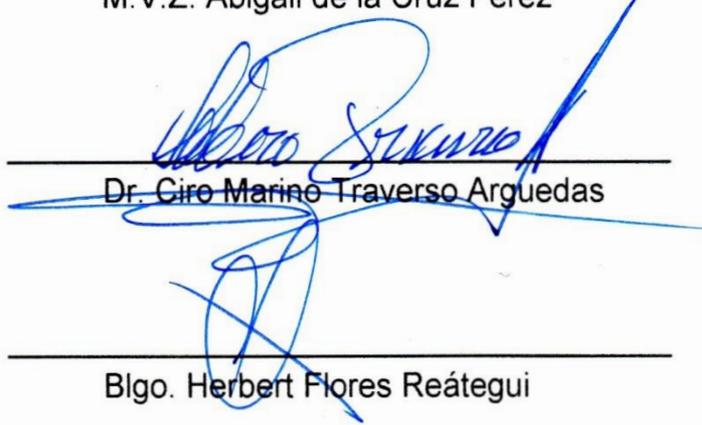
PRIMER MIEMBRO:

M.V.Z. Juan Zevallos Aragón

SEGUNDO MIEMBRO:


M.V.Z. Abigail de la Cruz Pérez

DIRECTOR DE TESIS:


Dr. Giro Marino Traverso Arguedas

ASESOR DE TESIS:

Blgo. Herbert Flores Reátegui

Area : Salud animal

Tema : Enfermedad parasitaria

DEDICATORIA

Para ti MARIO HUGO dedico este logro, fiel amigo y compañero de vida, siempre serás mi mejor maestro, te agradezco por toda la paciencia y amor brindados,

Para mi amado hermano José Gabriel ejemplo de perseverancia y amor, gracias por tu comprensión y apoyo incondicional.

Para mi querido hermano Abel, joven aun, alegría de mis días, cultivemos siempre esta bonita relación fraternal que nos ha regalado la vida.

Para ti ELSA que sacaste lo mejor de mí y que día a día con tu amor me permites construir este lindo proyecto de vida, ¡Gracias Amor Mío!

Para mi querida cuñada Marilú, gracias por toda la ayuda brindada en la culminación de este logro.

Para mi tía Rosa, gracias por los consejos y por tu paciencia, me hiciste siempre mejor persona.

Para mi amado hijo DIEGO FERNANDO, eres la verdadera razón de mi esfuerzo, gracias por ser el motor de mi vida.

FERNANDO.

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso por lo vivido y tropezado y aun más por lo gozado.

A la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

A mí amada Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, en cuyas aulas y laboratorios tuve la oportunidad de adquirir conocimiento profesional y cultivar grandes amistades.

A todos mis maestros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por sus experiencias y enseñanzas.

Al Dr. Ciro Marino Traverso Arguedas por su apoyo y consejos en la ejecución del presente trabajo.

A todo el personal técnico de laboratorio, gracias por el apoyo y amistad.

Un especial agradecimiento al señor Samuel, gracias por todas las facilidades brindadas en la biblioteca de la facultad.

A mis amigos Mike Suarez Matto, Nora Quintana Carrasco, Luis Manuel Vargas Gutiérrez, gracias por el apoyo y por los recuerdos.

FERNANDO.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	12
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1	Generalidades	14
2.2	Inmunología y Pruebas Diagnosticas	24
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1	Ubicación.....	43
3.2	Tipo de Estudio.....	43
3.3	Universo de Estudio	43
3.4	Tipo de Muestreo	43
3.5	Unidades de observación	45
3.5.1	Unidad de investigación	45
3.5.2	Unidad de análisis.....	45
3.6	Materiales	45
3.6.1.	Materiales para la obtención de muestras	45
3.6.2.	Equipo y materiales de laboratorio	46
3.6.1	Reactivos	47
3.7	Metodología.....	48
3.7.1	Obtención de muestras sanguíneas.....	48
3.7.2	Examen de órganos internos	48
3.7.3	Obtención del suero sanguíneo	49
3.7.4	Obtención del antígeno semipurificado para el Kit de ELISA	49
3.7.5	Cuantificación del antígeno	50
3.7.6	Sensibilización de la placa	51
3.7.7	Prueba de ELISA.....	52
3.8	Lectura de muestras del Kit de ELISA	54
3.9	Determinación de la Sensibilidad y Especificidad	55
3.10	Determinación del Valor Diagnóstico	56
3.11	Análisis Estadístico	57

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1 Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad del Kit de ELISA para el Diagnostico de Hidatidosis en Vacunos	58
4.2 Valor Diagnostico del Kit de ELISA para el Diagnostico de Hidatidosis en Vacunos	69
V. CONCLUSIONES.....	71
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. REFERENCIAS DE LITERATURA	73
ANEXOS.....	86

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de Antígenos (método de LOWRY)

Tabla 2. Resultados obtenidos de la lectura en espectrofotometría

Tabla 3. Lectura de densidades ópticas para el Kit de ELISA con antígeno semipurificado en el diagnóstico de hidatidosis en vacunos.

Tabla 4. Tabla tetracórica para determinar la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA.

Tabla 5. Tabla Tetracórica para la validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado en el diagnóstico de hidatidosis en Vacunos.

Tabla 6. Valores de densidad óptica para el diagnóstico de la hidatidosis en vacunos mediante el Kit de ELISA con antígeno semipurificado.

Tabla 7. Punto de corte para el diagnóstico de hidatidosis Bovina mediante el Kit de ELISA con antígeno semipurificado.

Tabla 8. Prueba de X2 para la prueba de ELISA con antígeno semipurificado

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- BSA:** suero de albúmina bovina
- Co-A:** coaglutinacion
- DO:** densidad óptica
- DS:** desviación estándar
- Dx:** Diagnostico
- EIF:** inmunolectroforesis
- EIT:** electroinmunotransferencia
- ELISA:** Prueba Inmunosorbente Ligada a Enzimas
- EQ:** equinococosis quística
- H₂O₂:** peróxido de hidrogeno
- HAI:** hemaglutinación indirecta
- IEP:** inmunolectroforesis
- IFI:** inmunofluorescencia indirecta
- IgA:** Inmunoglobulina A
- IgE:** Inmunoglobulina E
- IgG:** Inmunoglobulina G
- IgM:** Inmunoglobulina M
- KDa:** Kilodaltons
- LAT:** aglutinación de partículas de látex
- LH:** liquido hidatídico
- M:** molar
- ml:** mililitros
- nm:** nanómetros
- °C:** grados centígrados
- OIE:** Oficina Internacional de Epizootias

PAIR: punción – aspiración – inyección – re-aspiración

PBS: tampón fosfato salino y detergente

pH: potencial de hidrogeniones

rpm: revoluciones por minuto

SENAMHI: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria

VD: valor diagnostico

VP: valor predictivo

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

WB: western blot

X²: prueba de Ji cuadrado

µg: microgramo

µL: microlitro

RESUMEN

Se realizó la validación serológica del Kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) con antígeno semipurificado de la zona, para el diagnóstico de Hidatidosis en vacunos (*Bos taurus*). Las muestras serológicas fueron obtenidas de vacunos beneficiados en el Camal “Señor de la Agonía” ubicado en el distrito de Puno, provincia de Puno; habiéndose obtenido los siguientes resultados: La sensibilidad encontrada para la prueba serológica de ELISA con antígeno semipurificado de la zona, fue de 90.91% y una Especificidad de 92.22% en vacunos. El valor diagnóstico para la Prueba de ELISA con antígeno semipurificado de la zona para la hidatidosis en vacunos fue de 74.07%, con falsos positivos y falsos negativos que representan el 7.78% y 9.10% respectivamente.

Palabras claves: Kit de ELISA, antígeno semipurificado, hidatidosis, vacunos.

ABSTRACT

The serological validation of the ELISA Kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) with semipurified antigen from the area was performed for the diagnosis of Hydatidosis in cattle (*Bos Taurus*). The serological samples were obtained from cattle benefited in the Camal "Señor de la Agonía" located in the district of Puno, province of Puno; having obtained the following results: The sensitivity found for the ELISA serological test with semipurified antigen from the zone was 90.91% and a specificity of 92.22% in cattle. The diagnostic value for the ELISA test with semipurified antigen from the zone for hydatidosis in cattle was 74.07%, with false positives and false negatives representing 7.78% and 9.10% respectively.

Key words: ELISA kit, semipurified antigen, hydatidosis, cattle.

I. INTRODUCCIÓN.

La Hidatidosis en el Perú es una enfermedad parasitaria de alta incidencia especialmente en las regiones de mayor producción ganadera como la Región Puno, siendo esta una zona dedicada casi exclusivamente a la actividad pecuaria, teniendo pasturas naturales en su mayoría y pastos mejorados en menor cuantía, no existiendo un programa de manejo adecuado contra esta parasitosis, lo cual constituye un problema de salud pública y sanidad animal (Rojas, 2004).

La enfermedad se caracteriza por la transmisión del parásito *Echinococcus granulosus* del huésped definitivo (El perro y otros carnívoros) al hospedero intermediario (vacuno, ovino, cabra, cerdo, camélidos, equinos, venado, conejo y ocasionalmente el hombre). Los órganos afectados son: el hígado, pulmones y con mucho menor frecuencia corazón, riñón, bazo, peritoneo y cerebro de los animales. Las áreas de más prevalencia de hidatidosis, son aquellas áreas donde se crían animales domésticos para consumo humano (ovinos, vacunos, camélidos etc.) y la presencia simultánea de un gran número de huéspedes definitivos (perros y zorros) se combinan allí con la ignorancia y la irresponsabilidad del hombre creándose condiciones que hacen posible la transmisión cíclica de la hidatidosis: las deficientes condiciones de producción

pecuaria y la falta de infraestructura (camales) adecuados coadyuvan también a la mayor presentación o frecuencia de esta enfermedad (Acha y Szyfres, 2003).

En la actualidad, el diagnóstico y seguimiento de la hidatidosis en la práctica clínica está basado la mayor parte de las veces en la identificación de estructuras quísticas por técnicas de imagen (no aplicadas en vacunos), y confirmación del diagnóstico con técnicas serológicas de detección de anticuerpos específicos, generalmente las técnicas de ELISA e Inmunoblot utilizando como antígeno el líquido hidatídico. En general, esta aproximación permite el diagnóstico de un gran porcentaje de casos de hidatidosis (Hernández, 2012).

Dada la importancia que constituye la hidatidosis en salud pública y para llegar a un diagnóstico serológico eficiente es que el presente trabajo busca aportar con información sobre el diagnóstico de Hidatidosis en vacunos mediante la validación del Kit de ELISA elaborado con antígeno semipurificado de la zona, y su posterior aplicación práctica en los programas de control y prevención de esta enfermedad, permitiendo cambiar el enfoque y la orientación en el campo de la educación, prevención y control de esta parasitosis en la población afectada. Para este trabajo se planteó los siguientes objetivos: Determinar la Sensibilidad y Especificidad del Kit de ELISA elaborado con antígeno semipurificado en el diagnóstico de hidatidosis bovina, Evaluar el Valor Diagnóstico del Kit de ELISA con antígeno semipurificado en el diagnóstico de hidatidosis bovina.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Generalidades

La hidatidosis, enfermedad producida por la fase larvaria de *Echinococcus granulosus*, ha sido reconocido como uno de los mayores problemas de salud publica en el mundo (Moro et al., 1999; Dueger y Gilman, 2001). En el Perú, el problema es muy serio, porque afecta a gente de escasos recursos económicos y culturales, sobre todo en áreas de alta endemicidad como la sierra sur y central de los andes (Rojas, 2004; Moro y Schantz, 2006).

La hidatidosis es una enfermedad zoonotica de notificación obligatoria, que pertenece a la lista B de la OIE (oficina internacional de epizootias) (SENASA, 2008). Es una enfermedad parasitaria con un ciclo biológico completo, el ciclo de vida del parasito se lleva a cabo en dos hospedadores y sus características son propias de la familia a la que pertenece. La forma adulta se desarrolla en el intestino del perro y de otros carnívoros (Kose y Kirkali, 2008), y la larvaria se desarrolla en forma de quiste (“quiste hidatídico”) en las vísceras de animales ungulados, especialmente ganado ovino, caprino, bovino o porcino (Larrieu et al., 2004).

La hidatidosis que es causada por el *E. granulosus* que es un cestodo que pertenece al Phylum de los platelmintos con un cuerpo segmentado y sin tubo

digestivo (Barriga, 2002). Su tamaño oscila desde unos pocos milímetros a varios metros de longitud (Soulsby, 1987). Está formado por un escólex con los órganos de fijación, un corto cuello no segmentado y una cadena de segmentos (Urquhart et al., 2001; Cordero del Campillo et al., 1999).

La hidatidosis es una enfermedad clasificada dentro de las ciclozoonosis, que se transmiten naturalmente entre los animales y el hombre. Se entiende por zoonosis todas las enfermedades e infecciones en que puede existir relación animal – hombre, directamente o a través del medio ambiente, incluido portadores, reservorios y vectores. Aquellas zoonosis en la que el agente infeccioso debe pasar por más de una especie vertebrada, pero por ningún huésped invertebrado a fin de consumir su ciclo evolutivo, se denominan ciclozoonosis; a este grupo pertenece la equinococosis, la enfermedad se presenta en dos formas, en la etapa larval (metacestode) y en la adulta (tenia) del parásito (Correa *et al.*, 2000).

El *Echinococcus* es un género importante de la familia taenidae y uno de los cestodos más pequeños de los animales domésticos (Urquhart et al., 2001). Se reconocen cuatro especies del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*, que taxonómicamente exhiben características definidas que los identifica tanto en el estadio adulto como en el larvario. Las cuatro especies de *Echinococcus* pueden producir hidatidosis en el hombre (Denegri et al., 2002).

El *Echinococcus granulosus* es un cestodo diminuto que mide de 2- 7 mm de longitud. El parásito cuenta con un escólex o cabeza con cuatro ventosas y un

róstelo evaginable con una doble corona de ganchos. El escólex se continúa con un cuello corto al que se unen los proglotis (Sánchez, 2002; Acha y Szyfres, 2003; Mackey, 1973; Eckert y Deplazes, 2004; Barriga, 2002). Los parásitos adultos poseen de tres a cuatro proglotis. El último es el proglotis grávido. El proglotis grávido mide aproximadamente la mitad de la longitud de todo el cestodo. El proglotis grávido de la tenia contiene varios cientos de huevos, se desprende del parasito y sale al exterior con las deposiciones (Acha y Szyfres, 2003; Soulsby, 1987; Urquhart et al., 2001).

Los huevos de *E. granulosus* son esféricos o elipsoidales. El diámetro de los huevos varía entre 30 – 50 mm. los huevos del parasito salen en las heces del hospedador definitivo entre 4 – 5 semanas después de la infección. Cada huevo contiene un embrión u oncosfera con seis ganchos. La oncosfera está protegida por la membrana externa del huevo o embrióforo. El embrióforo es una envoltura gruesa, impermeable y muy resistente al medio ambiente (Denegri et al., 2002; Gottstein y Hemphill, 1997; Acha y Szyfres, 2003).

El quiste hidatídico es el estadio larval del *Echinococcus granulosus*. La pared del quiste está constituida por una capa cuticular externa, gruesa y laminada y por una capa germinativa, interna, fina y parenquimatosa. A partir de la capa interna del quiste hidatídico se producen un gran número de protoescólex. En general, el quiste hidatídico está cubierto por una capa de tejido conectivo producida por el hospedador intermediario (Kassai, 2002). Los quistes hidatídicos son esféricos, turgentes, llenos de líquido y miden comúnmente de 5 – 10 cm. De diámetro en los animales domésticos. En el hombre el quiste

hidatídico crece expansivamente entre 1 – 5 cm. De diámetro por año (Sánchez, 2002; Jubb et al., 1990).

Los vermes adultos de *E. granulosus* se caracterizan por su pequeño tamaño, con una longitud promedio de 2 – 11 mm (Soulsby, 1987; Cordero del Campillo et al., 1999). Poseen 22 ganchos grandes, 18 pequeños en el escólex y comúnmente presentan solo tres proglótidos, de los cuales solamente el último es grávido (Acha y Szyfres, 2003; Soulsby, 1987).

El cuello es el órgano de crecimiento del parasito y origina proglótidos inmaduros, maduros y grávidos (Denegri et al., 2002). Estos últimos están cargados de huevos, con insaculaciones laterales bien desarrolladas (Cordero del Campillo et al., 1999). El proglótido grávido normalmente se desintegra en el intestino, de modo que en las heces solo se encuentran huevos y no proglótidos (Soulsby, 1987). Los huevos son esféricos o elipsoidales y su tamaño varía entre 30 y 50 μm , siendo morfológicamente indistinguibles de los huevos de otros tenidos. (Denegri et al., 2002).

Los huéspedes definitivos de *E. granulosus*, son los perros domésticos y algunos canidos silvestres. El cestodo adulto vive prendido a las vellosidades de la mucosa del intestino delgado del huésped definitivo, mide de 3 a 6mm de longitud. Los huéspedes intermediarios son ovinos, bovinos, cerdos, caprinos, equinos, camélidos (asiáticos y americanos) cérvidos y el hombre. El quiste hidatídico en su forma larval de *E. granulosus* es típicamente unilocular. En los ovinos los protoescólices del quiste hidatídico se forman en cerca de 9 meses

después de la ingestión de los huevos. El ciclo se completa cuando un perro u otro canido ingiere vísceras con quistes hidatídicos que contienen protoescólices de un ovino o de otro huésped intermediario. El escólex se fija en la pared del intestino delgado del perro y se convierte en cestodo adulto que comienza a producir huevos infectantes a partir de los 47 – 61 días después de la ingestión de los protoescólices de la hidátide (Lloyd, 2001).

El quiste hidatídico se localiza principalmente en el hígado y pulmones, pero también en otros órganos como riñones, corazón, cerebro e incluso huesos de los hospedadores intermediarios y el hombre. La hidatidosis afecta a las ovejas, caprinos, vacunos, camellos, porcinos, caballos, etc. (Eckert y Deplazes, 2004). También los camélidos sudamericanos son hospedadores intermediarios del *Echinococcus granulosus* (Rojas, 2004; Ramírez, 1998).

El perro es el principal hospedero definitivo de *E. granulosus* y su infección se produce por la ingestión de vísceras con quistes hidatídicos fértiles, provenientes principalmente de ovinos (Gonzales et al., 2001). Después de la ingestión de los protoescólices, estos evaginan en la mucosa intestinal y se desarrollan hasta el estadio adulto. La maduración sexual ocurre entre 4 -5 semanas más tarde (McManus et al., 2003).

La equinococosis está asociada a la convivencia de los animales domésticos (alpacas, ovinos, bovinos, etc.) con perros y a la alimentación de estos con vísceras infectadas con quistes. Los ovinos, caprinos y cerdos son los reservorios más importantes, el 90, 80 y 35%, respectivamente, de quistes en

estas especies son fértiles; a diferencia en bovinos que solo alcanza un 5%; y en alpacas la fertilidad de los quistes es de 0.00% salvo en estados de baja resistencia, en cuyo caso puede alcanzar un 5%. Se ha reportado que en el 100% de los quistes hidatídicos, tanto en pulmones como de hígado en las alpacas son acefaloquistes o infértiles. A partir del quinto mes se forman mediante proliferación asexual de la capa germinal, las vesículas prolíferas. Inicialmente son como pequeñas masas nucleares o yemas que proliferan hacia el interior de la cavidad, crecen, se vacuolizan y quedan unidas a la capa germinal por un pequeño pedúnculo. En su interior tiene lugar un proceso asexual de gemación que se repite y da lugar a la formación de miles de protoescólex que persisten durante un tiempo variable dependiendo fundamentalmente del hospedador. Los quistes que no contienen protoescólex reciben el nombre de acefaloquistes o estériles, mientras que los quistes fértiles y viables tienen protoescólex vivos sobre la membrana prolífera y también en el líquido hidatídico, denominados arenilla hidatídica. Algunos quistes contienen numerosas vesículas hijas exógenas o externas que parecen formarse en la zona perinuclear y son transportadas de forma continua hacia la periferie (Mehlhorn et al., 1993) (Bustinza, 2001).

El proglótido grávido contiene varios cientos de huevos, este, en algunas oportunidades, se desprende de la estrobila, sale al ambiente externo con las deposiciones y allí se desintegra (Acha y Szyfres, 2003; Soulsby, 1987). Los huevos allí depositados, son infectantes inmediatamente y si son ingeridos por los ungulados o accidentalmente por el hombre, se libera el embrión hexacanto y atraviesa una vénula intestinal o un vaso linfático para alcanzar el hígado o

los pulmones (Soulsby, 1987). A las 3 semanas, la hidátide mide unos 250 μ m de diámetro y ya presenta una cavidad central. Alrededor del quinto mes ya mide aproximadamente 1 cm. y se advierte que su pared esta constituida por dos capas: una externa, cuticular o laminar y una interna, germinativa o prolifera, la cual origina al elemento infectante o protoescólex (Acha y Szyfres, 2003).

El *E. granulosus* se instala en la mucosa entérica del perro, permanece ahí por un lapso de tiempo de 2 ó 3 años durante el cual libera a través de la materia fecal los huevos. Los perros empiezan a expulsar huevos del parásito alrededor de la séptima semana de la infección, El género *Echinococcus* representa a un grupo de cestodes (vermes) muy pequeños y de gran importancia para la salud pública. De las tenias que afectan al hombre es la más común de todas. Los proglótidos son más largos que anchos, tienen un poro genital simple alternado irregularmente. Son hermafroditas, los huevos miden 30 μ m y poseen una membrana gruesa y radiada. No poseen cámara de aire, en el interior se encuentra la oncósfera o embrión hexacanto, llamado así por poseer tres pares de ganchos (Drugueri, 2002).

El metacestode es un quiste unilocular, de forma esférica y relleno de un liquido claro denominado liquido hidatídico. El liquido hidatídico es una mezcla compleja de sales, lipoproteínas y otros compuestos orgánicos que son la principal fuente de antígenos para el inmunodiagnóstico (Rogan et al., 2006).

Al ser ingeridos los alimentos contaminados con huevos de *E. granulosus*, por digestión del cascarón (capsulación), se disuelve y la oncósfera se libera, luego

pasa a la luz intestinal. Los embriones hexacantos en forma activa atraviesan la pared intestinal llegan al sistema porta y son arrastrados por el flujo sanguíneo hacia el hígado (primer órgano infestado), luego los embriones llegan al corazón derecho por la circulación venosa que los lanza a los pulmones (segundo órgano infestado), algunos avanzan al corazón izquierdo en donde son enviados a la circulación general para ir a desarrollarse en diferentes tejidos (mesenterio, riñón, bazo, corazón). Sin embargo la mayoría ha quedado en el hígado y pulmón (Men *et al.*, 1999).

La difusión y el mantenimiento de la Hidatidosis se realiza con la intervención de animales domésticos o silvestres aparte de otros factores de tipo social relacionados con determinadas prácticas zootécnicas, de forma que las tasas de infección es más elevada cuando se practica el pastoreo de animales por el hombre, el cual supone un estrecho contacto perro/oveja. Intervienen así mismo, otros factores de tipo social que limitan la puesta en práctica las medidas de control, aparte de otras condiciones intrínsecas del propio parásito, tales como su intenso potencial biótico, la supervivencia de los vermes adultos o la alta resistencia de los huevos. El desarrollo hasta adulto comprende la diferenciación germinal y somática, conformación de proglotis y la maduración de estos, una vez formado, el proglotis grávido se desprende del estróbilo y con las heces salen al exterior, a los 30 días comienza la producción de huevos. Cada cestodo produce diariamente 34 – 58 huevos y la mayor parte de estos se eliminan en el intestino antes de que los proglotis grávidos salgan al exterior. Los vermes adultos sobreviven en el intestino entre 6 – 24 meses (Huenece, 1995).

Los elementos constituyentes del quiste hidatídico son: la hidátide se forma desde el momento de la implantación del embrión hexacanto del parásito en el parénquima hepático al que llega por la circulación porta, luego de haber traspasado la pared intestinal. Anidado en un capilar intraparenquimal del hígado y/o pulmón, el embrión genera una vesícula con una pared que será la membrana hidatídica que consta de una capa externa quitinosa y una interna germinativa. Esta vesícula va desarrollando y creciendo progresivamente a razón de 1 cm por año, aproximadamente. Esta hidátide condiciona alteraciones en el parénquima hepático circundante, produciendo un proceso inflamatorio compatible al tejido de granulación con varias capas, que la etapa madura se presenta como una membrana consistente, fibrosa que puede sufrir alteraciones de diferente índole (Ruiz, 2001).

El crecimiento del quiste dependerá del potencial evolutivo del embrión hexacanto, del tejido circundante y de la resistencia del huésped. Puede ser muy rápido (5 ó 10 cm en pocos años) y generar síntomas graves con riesgo de muerte para el portador o puede comportarse en forma benigna, crecen no más de 2 – 7cm y envejecen con su portador sin producir daño a la salud (Larrieu et al., 2002).

El Echinococcus granulosus adulto, es un gusano chato alargado con simetría bilateral que mide 2 a 8mm de longitud, está recubierto por un tegumento o cubierta protectora a través del cual absorbe nutrientes y excreta desechos. Posee un escólex o cabeza pequeña dotada de cuatro ventosas y una corona de ganchos que le permiten anclarse sobre la pared intestinal de su huésped. En el extremo trasero del escólex hay un cuello corto y delgado en el que se

generan asexualmente los segmentos del cuerpo, o proglótidos. Cada uno de ellos contiene órganos para la reproducción sexual, tanto testículos como ovarios. El número de proglótidos es variable, pero generalmente es de tres. La última es grávida y una vez madura se separa del cuerpo del gusano y escapa del huésped junto con sus heces contaminando el suelo, los pastos, verduras y el agua. Estos proglótidos recién desprendidos contienen multitud de huevos (500 a 800) y cada uno contiene un embrión, en realidad se eliminan las proglótidos grávidos que en la región perianal se desintegran liberando los huevos (Noé, 2003).

La hidatidosis se transmite naturalmente entre los animales y el hombre. Esta enfermedad está causada por helmintos del género *equinococcus*. Dentro del cual reconocemos cuatro especies: *granulosus*, *multilocularis*, *vogeli*, *oligarthrus*. El *equinococcus* necesita de dos mamíferos para completar su ciclo básico, el huésped definitivo es un carnívoro, mientras que el intermediario es un herbívoro (Ramos, 2006).

El 96% de los quistes en ovinos son fértiles y el 100% cuando se localiza en el hígado frente al 32,9% de los bovinos. Los protoescólices existentes en los quistes hidatídicos resisten entre 3 – 6 días cuando se encuentra en las vísceras, mientras que si están aislados solamente conservan su vitalidad durante unas horas y hasta 3 días (Cordero del Campillo et al., 1999).

En el ganado los efectos del quiste hidatídico son imperceptibles y cursan asintómicamente, dado el corto periodo de vida de los animales de abasto. El

tamaño de los quistes no llega a generar sintomatología, aun en casos de gran capacidad de quistes hepáticos y pulmonares (Rojas, 2004).

Los costos por pérdidas en animales, es otro de los costos asociados con la equinococosis quística. Básicamente por la gran cantidad de vísceras que son decomisadas y eliminadas, especialmente el hígado (Torgerson, 2003). A estas se suman la reducción de peso de las carcasas, la disminución del valor de la carcasa, disminución de la producción de leche y descenso de la fecundidad (Budke et al., 2006).

Los factores que favorecen la proporción de la Hidatidosis en Puno, se consideran a la población rural, saneamiento ambiental deficiente o nulo, falta de canales, matanza clandestina y hogareña, condiciones climáticas favorables al ciclo biológico del parásito en animales y humanos. El departamento de Puno, se considera una zona de Hidatidosis humana, en nuestro país la Hidatidosis hepática tiene menor frecuencia que la pulmonar, lo que no sucede en otros países. En Puno se ha observado aproximadamente un caso de quiste hidatídico hepático por cuatro de quiste hidatídico Pulmonar siendo, las zonas más infestada Melgar y Lampa (Frisancho, 1993).

2.2 Inmunología y Pruebas Diagnosticas

El *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ha sido el test más utilizado para la detección de antígenos circulantes en pacientes con hidatidosis, y menos frecuentemente la coaglutinación (Co-A), la aglutinación de partículas

de látex (LAT) y la inmunoelectroforesis (IEP), la metodología es la detección de los antígenos mediante el uso de anticuerpos policlonales procedentes de un suero hiperinmune frente al líquido hidatídico, y poco frecuentemente se han utilizado anticuerpos monoclonales, por lo que es frecuente encontrar reactividades cruzadas con otros parásitos. La muestra clínica en la que se trata de detectar los antígenos es habitualmente el suero, aunque en ocasiones se ha ensayado esta detección en orina (Hernández, 2012).

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

Se empleó la técnica de ELISA en microplacas con 96 pocillos de fondo plano (12x8). Las placas se incubaron con 100 µl del antígeno semipurificado en cada pocillo. Este antígeno se diluyó en "buffer" carbonato a pH 9,6. Las placas con el antígeno fueron incubadas por 3 horas a 37°C, en este primer ensayo se determinó la dilución óptima del antígeno, de los sueros y del conjugado una IgG anti ovina marcada con Peroxidasa (SIGMA, MO, USA). En la titulación para la proteína de 29kDa de la prueba de ELISA, se seleccionó en un primer momento 4 mg/ml de proteína, diluciones de 1/64 de suero y de 1/4.000 de

conjugado. En el caso de la proteína de 14kDa, la titulación dio 1 mg/ml de proteína y dos diluciones de suero (1/32 y 1/64), pero una sola dilución de conjugado (1/4.000). El revelado se hizo con una solución de ortofenildiamina más H₂O₂, la reacción se detuvo al adicionar 25µL de ácido sulfúrico 2,5 M por pocillo y se llevó a un lector automático de ELISA a 492nm, que nos entregó la densidad óptica. Los sueros se analizaron en duplicado y se usó el promedio de sus DO, considerando como positivos a aquéllos sueros cuyas DO fueran mayores al doble de las DO promedio de los 3 controles negativos ("cut off") que se incluyeron en cada placa. Los controles positivos utilizados fueron ovinos infectados experimentalmente que luego fueron sacrificados comprobando su positividad al examen post mortem. Los controles negativos fueron sueros de ovinos de la XII región (Gorman *et al.*, 2000).

Aunque existen métodos serológicos como hemoaglutinación indirecta, doble difusión, inmunofluorescencia indirecta y ELISA, y pruebas de hipersensibilidad retardada como el Test. de Casoni, se recomienda mezclar por lo menos dos métodos serológicos, con métodos imagenológicos, tales como ultrasonografía, tomografía computarizada y resonancia magnética, con lo cual se detectan más del 50% de los casos positivos. Los falsos positivos en la serología obedecen a que se dan reacciones cruzadas con otros nematodos, por lo cual se recomienda acudir a un método más específico como es la presencia del arco cinco de Capron en inmunoprecipitación. En casos hepáticos la Sensibilidad es del 90%, pero que en localizaciones pulmonares está baja hasta menos del 50% (Morlas, 2001)

En la evaluación de la prueba de aglutinación en látex estandarizada para el diagnóstico serológico de la echinococosis quística, se utilizó partículas de látex de 0,25 μm de diámetro, las cuales fueron sensibilizadas con antígeno total de líquido liofilizado de quiste hidatídico de ovino. Se usaron 80 sueros, 40 de pacientes operados por enfermedad hidatídica confirmada por patología, se encontró que de los 40 sueros de pacientes con hidatidosis uno dio resultado negativo y de los 40 sueros de pacientes o personas sin hidatidosis cuatro dieron resultados positivo obteniéndose una Sensibilidad de 97,5%, una Especificidad de 90,0%, un valor predictivo positivo de 90,7% y negativo de 97,3%, siendo la concordancia encontrada al evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del 100% en laboratorios de zonas endémicas (Miranda, 2009).

El diagnóstico inmunológico es de gran valor, mediante la detección de anticuerpos circulantes contra los antígenos de la fase larval. Las pruebas conocidas, de aplicación práctica por su sencillez, Especificidad y Sensibilidad, son la inmunoelectroforesis, aglutinación de látex, hemaglutinación indirecta, doble difusión arco 5, ELISA y anticuerpos monoclonales (Leto y Ponce, 2006).

Un estudio de evaluación serológica por el método de ELISA y doble difusión del arco 5 en el diagnóstico de la hidatidosis bovina, realizado en el camal municipal de Juliaca, obtuvo una Sensibilidad de 72.22% y una Especificidad de 82.35% con 17.65% de falsos positivos y 27.78% de falsos negativos; así mismo un valor diagnóstico de 77.28% (Quiza, 2003).

En la técnica de ELISA se emplea líquido hidatídico total ovino, tomando como positivo los valores que superan la media más 3 desvíos estándar, para obtener el valor de corte se emplearon sueros de pacientes sin antecedentes epidemiológicos de EQ (es indispensable que cada laboratorio establezca su propio valor de corte, determinado bajo las condiciones de trabajo). Para evaluar la técnica de ELISA se analizaron 670 muestras, obteniendo una Sensibilidad del 99% y una Especificidad del 96% (Denegri et al., 2002).

Se determinó el diagnóstico de hidatidosis en alpacas mediante la evaluación serológica por el método de ELISA (Prueba Inmunsorbente Ligada a Enzimas) de uso comercial para uso humano, llevado a cabo en el laboratorio de patología clínica de la ciudad de Arequipa, en 66 alpacas beneficiadas en el camal municipal de Ayaviri, que mediante la inspección de vísceras, observación y confirmación de los quistes al examen post mortem se obtuvieron los siguientes resultados: la prevalencia momentánea en alpacas fue de 16.67% no existiendo diferencia significativa para las variables raza, sexo y edad; el órgano mayormente afectado fue el hígado frente al pulmón mostrando diferencia significativa. La Sensibilidad fue de 72.72%, Especificidad de 83.64%, con 16.36% de falsos positivos, 27.27% de falsos negativos y el valor diagnóstico fue de 47.06% (López, 2003).

Un estudio para determinar la sensibilidad, especificidad, y valor diagnóstico del Kit de ELISA, con antígeno semipurificado de la zona, en el diagnóstico de hidatidosis en ovinos beneficiados en el Camal Municipal del distrito de Ayaviri de la provincia de Melgar, obtuvo los siguientes resultados: una Sensibilidad de

82.35% y una Especificidad de 92.95% en ovinos, el valor diagnóstico para la Prueba de ELISA con antígeno semipurificado de la zona, en ovinos para la hidatidosis fue de 73.68% (Tito, 2010).

En un estudio de validación serológica del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en alpacas, realizado en el ámbito de las provincias de Lampa y Melgar; se obtuvo una sensibilidad de 86.11%, una especificidad del 80.04% y un valor diagnóstico de 77.05%, con falsos positivos y falsos negativos que representan el 19.50% y 13.90%, respectivamente (Bojórquez, 2012).

La correcta interpretación del test serodiagnósticos para hidatidosis, requiere la comprensión de los factores que pueden influir en los resultados. Los resultados negativos no excluyen Equinocosis ya que algunos antígenos no producen anticuerpos detectables. La respuesta inmune detectable, ha sido asociada a la localización, la integridad y la vitalidad del quiste larval. Los quistes en hígado despiertan una mayor respuesta que los quistes en pulmones. Los quistes en cerebro y bazo se asocian a baja reactividad serodiagnóstico. La fisura o ruptura del quiste produce una abrupta estimulación de anticuerpos. Los quistes calcificados, muertos o envejecidos no estimulan al huésped, quien será seronegativo. Otra causa de resultados seronegativos es la unión de los anticuerpos a complejos inmunes circulantes. El antígeno circulante fue detectado en un 50% de tales especímenes, reporta el desarrollo de la fase larvaria, dando lugar a una respuesta humoral y una reacción celular (Quiroz, 2005).

La inmunidad y mecanismo de resistencia contra helmintos en los mamíferos, no parece haber tenido mucho éxito en el campo de la resistencia contra las infecciones por helmintos. La inmunidad contra los helmintos, los anticuerpos convencionales de los isotipos IgM, IgG, e IgA se producen en respuesta a los antígenos de los helmintos, cada vez surgen más pruebas de que el isotipo de inmunoglobulinas que participa con mayor intensidad en la resistencia a los helmintos es IgE. Una característica que debe considerarse para interpretar los resultados de la serología, es la posibilidad de cometer errores. Los errores técnicos suelen evitarse incorporando los testigos apropiados al método de prueba. Sin embargo, existen otros que son inevitables, los falsos positivos y falsos negativos. Se considera inespecífica una prueba en la cual una gran proporción de los resultados positivos son falsos, en tanto que suele considerarse poco sensible aquella con una proporción muy alta de resultados falsos negativos. De este modo las pruebas muy sensibles tienden a ser, en términos relativos poco específicos, y las pruebas muy específicas en general, tienden a ser poco sensibles (Tizard, 2009).

La respuesta inmunitaria de los animales puede emplearse en dos formas generales en el laboratorio de diagnóstico. En primer término, pueden usarse anticuerpos específicos para detectar o identificar un antígeno. En segundo, la detección de anticuerpos específicos en el suero permite establecer si un animal estuvo expuesto a un antígeno en especial. La medición de las interacciones antígeno-anticuerpo con fines diagnósticos se denomina serología. Las técnicas de serología diagnóstica caen en tres categorías generales: las pruebas de unión primaria, que miden directamente el enlace de antígeno y anticuerpo (ELISA, Radio inmunoanálisis competitivo); las pruebas

de unión secundaria, que miden los resultados de la interacción antígeno – anticuerpo in vitro (precipitación en gel, pruebas de fijación del complemento); y las de unión terciaria, que miden el efecto protector real de los anticuerpos en un animal. Entre las técnicas más importantes de inmunoanálisis está la prueba inmunosorbente ligada a enzimas ELISA, esta puede utilizarse para detectar y cuantificar tanto anticuerpos como antígenos, este complejo se une a los anticuerpos y después de la incubación y del lavado, se detecta y mide la intensidad del color, que será proporcional a la cantidad de antiglobulina ligada a la enzima que se haya captado, la cual, a su vez, será proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en el suero que se está analizando. La intensidad del color se estima a simple vista o aún mejor mediante espectrofotómetro (Tizard, 2009).

Otros medios de diagnóstico que se han constituido en una gran ayuda son los serológicos (arco v, ELISA o Western Blot) pero lamentablemente han mostrado un bajo rendimiento para hidatidosis pulmonar (Stiglich et al., 2004; Acha y Szyfres, 2003). En un estudio realizado entre pacientes sintomáticos con hidatidosis confirmada por cirugía, 80% de los casos han dado resultados serológicos positivos en las pruebas de hemaglutinación indirecta, de 82 a 88% resultaron positivos a los de DD5, 82% en la inmunoelectroforesis y de 88 a 96% en la inmunoadsorción enzimática o ELISA (Larrieu et al., 2000).

El líquido hidatídico (LH) es producto del metabolismo del parásito, casi transparente. Permite el intercambio de nutrientes con el huésped, y le da la característica semiológica a la enfermedad hidatídica. El 98% corresponde a

agua que contiene cloruro de sodio, urea, ácido úrico y vestigios de albuminas y grasas (Vera et al., 2003). Algunos de sus componentes provienen del hospedador (principalmente albuminas e inmunoglobulinas), mientras que el resto son producto de la actividad metabólica del metacestode. Posee propiedades antigénicas y su densidad es de 1.007 a 1.012 y el pH de 7.4 (Carmena et al., 2007).

Tal y como acabamos de mencionar, el LH ha sido la principal fuente de antígenos utilizada para el diagnóstico primario y también para el seguimiento de pacientes (Ortona et al., 2003) El LH consiste en una mezcla compleja de glicoproteínas y lipoproteínas, carbohidratos y sales. Algunos de sus componentes proceden del hospedador, como albumina e inmunoglobulinas, y otros son el resultado de la actividad metabólica del metacestode. La fertilidad, viabilidad de protoescolices y procedencia del quiste pueden afectar a la reactividad inmunológica del LH (Carmena et al., 2006). El LH procedente de quistes fértiles de oveja ha sido usado rutinariamente en la preparación y estandarización del antígeno, aunque también se ha utilizado como fuente antigénica alternativa LH de quistes bovinos y de camello (Zhang et al., 2003).

En líquido hidatídico es el principal factor responsable de la estimulación antigénica. La capa laminar, acelular y no degradable del quiste, no estimula el sistema inmunitario del hospedero, aunque se comporta como un filtro que permite el paso de macromoléculas (Larrieu et al., 2000). Más bien esta capa laminada que rodea al quiste, está implicada en la protección del parásito de la respuesta inmune (Holeman y Heath, 1997).

Con relación al hospedero definitivo, la inmunología ha agregado a los métodos tradicionales de purga con arecolina y necropsia, la búsqueda de anticuerpos séricos específicos y la revelación de antígenos de *E. granulosus* en las heces de los perro. Esta se realiza por medio de un método de ELISA de captura de anticuerpo, del cual ya existen preparados comerciales. La prueba ha mostrado poseer Sensibilidad y Especificidad adecuadas, en razón de lo cual se ha transformado en herramienta muy útil para la epidemiología y el control, puesto que elimina los riesgos de las purgas (Shehabi et al., 2000).

También se pueden realizar pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o el ELISA para detectar anticuerpos contra *Echinococcus*, que resultan positivas en 85% de los casos con quistes hepáticos (Gonzales et al., 2001).

Aunque el número de pacientes con un nivel detectable de anticuerpos específicos es mayor que el de pacientes con antígenos circulantes detectables, se encuentra todavía un porcentaje de pacientes con hidatidosis que resulta negativo en todas las pruebas empleadas hasta ahora para la detección de anticuerpos. Durante varias décadas, se han llevado a cabo numerosos trabajos tratando de mejorar la Sensibilidad, y también la Especificidad de este tipo de pruebas indirectas. Algunos se han centrado en la comparación de diferentes técnicas, otros en la detección de inmunoglobulinas diferentes y otros estudios en el uso de distintos antígenos (Hernández, 2012).

La fuente de material antigénico va a ser un punto crucial en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis (Siracusano et al., 2009). Los antígenos que se han utilizado son principalmente el líquido hidatídico (LH) o mezclas antigénicas parcialmente purificadas del mismo, y ocasionalmente se han probado otras fuentes como extractos somáticos de protoescolices y vermes adultos, productos de excreción – secreción, y extractos de oncosferas (Carmena et al., 2006). En general, el uso de estas mezclas antigénicas crudas presenta problemas de reactividad cruzada con pacientes con otras parasitosis, especialmente cisticercosis e hidatidosis alveolar, debidos a *Taenia solium* y a *E. multilocularis*, respectivamente, disminuyendo mucho la Especificidad del test. Así mismo, se encuentra un porcentaje de pacientes que resulta negativo a estos extractos, dando lugar a Sensibilidades mejorables. Otro problema que presentan los extractos crudos parasitarios es la imposibilidad de estandarización, por la variabilidad de un extracto a otro, lo que hace que los resultados obtenidos en distintos laboratorios puedan ser muy diferentes entre sí (Tawfeek et al., 2011).

En la detección de anticuerpos en la sangre de los perros infectados utilizando un preparado de antígenos del metacestode del *Echinococcus granulosus* en la prueba de ELISA. También se han empleado antígenos derivados de la oncosfera para la detección de anticuerpos específicos (OIE, 2004). Esta prueba tiene una Sensibilidad pobre y la Especificidad aun no está clara (Zhang et al., 2003).

La fracción de 25 kDa separada de un extracto antigénico de oncósferas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, inducía inmunidad protectora en el hospedero intermediario. En el mismo año, obtuvieron una proteína recombinante de 16.5kDa, a la cual denominaron EG 95 y, mezclándola con un adyuvante (saponina, Quil A o ISA70), lograron proteger a ovinos contra el desarrollo de quistes hidatídico. La inmunidad es mediada por anticuerpos fijadores de complemento, persiste por lo menos un año si es suministrada en dos dosis separadas por intervalos de 1 mes, se transmite pasivamente a los neonatos y protege contra diferentes cepas de *E. granulosus*. Tales características han transformado esta vacuna en un valioso instrumento para el control de la transmisión de la hidatidosis (Lightowlers *et al.*, 2006).

Con la llegada de nuevos procedimientos, las técnicas clásicas, como la prueba intradérmica de Casoni, la fijación de complemento, la hemaglutinación indirecta y la precipitación de partículas inertes, han sido sustituidas por la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA), la inmunoelectroforesis (EIF) y la electroinmunotransferencia (EIT). La selección de una prueba inmuno-diagnóstica, debe basarse principalmente en la calidad del preparado antigénico, así como en las propiedades intrínsecas del procedimiento: Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos positivos y negativos. Los antígenos empleados, la clase de inmunoglobulina revelada y el estado de los quistes son variables de gran importancia para la evaluación del inmunodiagnóstico. La determinación de IgG1 mejora la Sensibilidad, la Especificidad y el VP, por lo que las técnicas basadas en su detección son hoy en día las más recomendadas (Ramzy *et al.*, 1999).

El Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS – " Carlos G. Malbran" – Argentina, indica que utilizan la técnica de ELISA con líquido hidatídico total de oveja como antígeno , obteniendo un valor de corte igual a la media más 3 desvíos estándar (los valores de corte del ELISA para hidatidosis pueden variar desde +2DS hasta +8 DS), con un valor de corte igual a una densidad óptica de 0.260, la Sensibilidad es de 99% ,la Especificidad de 96% y un Valor predictivo positivo de 92% (Santillan, 2002).

La presencia o ausencia de anticuerpos se determina relacionando la absorbancia de la muestra a 490 nm respecto al valor de corte. Se ha definido el valor de corte como el punto de cruce entre el promedio de las lecturas de los sueros controles no reactivos y reactivos mas dos desviaciones estándar (INS, 2002).

Si nos referimos al uso de antígenos purificados nativos, la mayoría de los estudios se han centrado en el uso de las lipoproteínas antigénicas B (AgB) y 5 (Ag5), componentes mayoritarios y altamente inmunogénicos del LH (Siracusano et al., 2009).

En general, los antígenos nativos, tanto crudos como purificados, dan lugar a resultados extremadamente variables, variabilidad que vendrá determinada, entre otros, por la dificultad de su estandarización, puesto que deben ser obtenidos de infecciones naturales y cada lote tendrá una composición diferente. Esta variabilidad también puede ser atribuida en el caso de antígenos purificados a la falta de un consenso en cuanto a los métodos de purificación

de determinados antígenos, y con el fin de solucionar los problemas de estandarización antigénica, y tratar de mejorar la Sensibilidad y Especificidad en el diagnóstico serológico, se ha trabajado en la producción de antígenos recombinantes. Estos pueden ser diseñados y obtenidos en grandes cantidades, de una forma estandarizada y homogénea, a partir de bacterias *Escherichia coli* que hayan sido transformadas con un plásmido que codifique un antígeno o fragmento(s) antigénico(s) determinado del parásito. Con los mismos objetivos, se han producido y ensayado algunos péptidos sintéticos derivados de secuencias antigénicas de *E. granulosus* (Hernández, 2012).

El examen de Elisa Inmunoglobulina G, es un examen que ha logrado desplazar a los anteriores debido a su Sensibilidad de un 93% y valor predictivo positivo elevado, los falsos positivos fueron inferiores al 3% (Vera, 2003).

Se describe una prueba cualitativa. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para el inmunodiagnóstico de hidatidosis. El ELISA fue estandarizado usando líquido hidatídico proveniente de quistes desarrollados naturalmente en hígado de oveja. El ELISA - HID fue usado como test de screening para detectar anticuerpos específicos anti IgG en muestras de sueros de 17 pacientes confirmados por cirugía; fueron empleadas como sueros controles positivos, 26 muestras de sueros de personas sanas y 9 sueros de pacientes con otras infecciones por cestodos u otras infecciones. Los resultados del test de ELISA- HID mostraron que el test tiene una Sensibilidad y Especificidad del 100 % y 96 % respectivamente. Observaron una relativa frecuencia de reacciones cruzadas con otras enfermedades parasitarias (cisticercosis). Estas

reacciones cruzadas con otros cestodos pueden ser resueltos testando estos con pruebas más específicas complementarias como el Inmunobloting. La excelente Sensibilidad y Especificidad del ELISA- HID hace que el test sea una importante herramienta de diagnóstico para detectar anticuerpos específicos contra la equinococosis, cuyos resultados positivos pueden ser valorados por test confirmatorios como el Inmunobloting. Estas variaciones de Sensibilidad y Especificidad están relacionadas con la calidad, naturaleza, (preparación y purificación del extracto antigénico), inmovilización del antígeno, como también de la metodología seleccionada para la actividad enzimática, conjugado, sustrato, dilución empleado en los sueros o el criterio empleado para el cálculo del Cut Off. El cálculo del Cut Off se determinó con la media de 3 controles negativos más 3 desviaciones estándar (Flores y Rodríguez, 2006).

Estudios han reportado una Sensibilidad del 80% para hemaglutinación indirecta (HAI), de 82 a 88% para doble difusión arco cinco (DD5), 88 a 96% para el ELISA y 92% para western Blot. La Especificidad de estos métodos varía desde 95% en la HAI, 93% para ELISA y 96% para WB (Stiglich et al., 2004).

Se evaluó la producción de anticuerpos policlonales de conejos, dirigido a un extracto antigénico procedente de líquido de quistes hidatídicos, por aplicación de la E.I.T. Los epítomos antigénicos reconocidos por SPCLH fueron similares a los identificados por SPCTA. También se estudió su potencial aplicación como sustrato de sensibilización en ELISA Coproantigénica, con tal propósito se ensayaron 50 muestras fecales de perros con y sin infección, mostrando una

Sensibilidad de 64%, Especificidad 100%. Además VPP y VPN mostraron resultados de 100% y 97,6%, respectivamente (Vargas *et al.*, 2005).

Hasta hace poco tiempo, la hidatidosis se consideraba un estado patológico de resolución exclusivamente quirúrgica. Sin embargo, en los últimos años se ha avanzado en los campos de la epidemiología, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad y la nueva información aportada sobre la historia natural de la hidatidosis ha permitido definir nuevos criterios de atención. Ahora se sabe que hasta 67% de los portadores no sintomáticos de quistes hepáticos mantienen esa condición durante toda la vida. Esta situación genera resultados especiales en el inmunodiagnóstico. La inmunoabsorción enzimática (ELISA) rinde una Sensibilidad de 63% y una Especificidad de 97% en portadores asintomáticos, mientras que la doble difusión cinco (DD5) tiene una Sensibilidad de solo 31% en esos portadores. Por otra parte, estudios por imágenes basados en la ecografía se han transformado en el método de elección para detectar a los portadores no sintomáticos. Son de 49 a 73% más sensibles que la serología e incluso pueden utilizarse como parte del sistema de vigilancia epidemiológica y del monitoreo de programas de control. También se han modernizado los esquemas de intervención. El tratamiento quimioterápico de portadores asintomáticos con albendazol produce hasta 69% de respuestas favorables, mientras que los tratamientos quirúrgicos mínimamente invasores como la punción -aspiración -inyección – re-aspiración (PAIR) producen una reducción del volumen medio del quiste de hasta 66%. Estos factores han permitido instaurar un protocolo de tratamiento para portadores asintomáticos en los servicios hospitalarios de la Provincia de Río Negro, Argentina (Larrieu, 2000).

Se caracterizó y optimizó el antígeno del líquido hidatídico de ovino y se aplicó en la prueba de látex como prueba tamiz para el diagnóstico serológico de pacientes con quistes de *E. granulosus*. Se evaluó 40 sueros, 15 de hidatidosis positivos por inmunoblot, 10 de pacientes con otras enfermedades parasitarias y 15 de personas sanas. Tres de los 15 sueros de hidatidosis resultaron negativos y 0/25 sueros sin hidatidosis fueron reactivos. Se obtuvo una Sensibilidad de 80%, Especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 83,3 y una concordancia del 100% al evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de la prueba. Se recomienda el uso de esta prueba para el diagnóstico de la hidatidosis por ser simple, rápida y reproducible, como Kit en laboratorio o en campo para estudios epidemiológicos (Fuentes *et al.*, 2009).

No existe actualmente un test serológico con una Sensibilidad y Especificidad del 100% para la detección de anticuerpos anti – *Echinococcus granulosus*. Se pueden dar falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otros parásitos. Es por ello por lo que el resultado serológico ha de confrontarse con los hallazgos radiológicos (Junquera *et al.*, 2005).

Otras variables que pueden influir en los resultados dispares son los distintos criterios a la hora de establecer un valor de corte, así como el uso de diferentes tratamientos estadísticos para determinar la Sensibilidad y Especificidad de un test, que pueden dar lugar a una variación de los resultados aunque se parta de los mismos datos en origen (Lorenzo *et al.*, 2005).

Las pruebas serológicas permiten un diagnóstico específico, pero para que tengan algún valor se requiere de una reacción antígeno/anticuerpo, lo cual requiere de una capacidad de respuesta inmunológica del huésped y del contacto de este sistema inmunocompetente con los antígenos (fisura o rotura de la capa germinativa). Ninguna de las técnicas permite por sí sola el diagnóstico de certeza por lo que suelen asociarse al menos dos de ellas. Inmunoelectroforesis (Arco 5). Examen de uso frecuente, de fácil realización, 100% de Especificidad pero de Sensibilidad baja, por lo que un resultado negativo no descarta el diagnóstico. Hemoaglutinación. Sensibilidad del 80% en afectación hepática y 65% en lesiones pulmonares (Vera et al., 2003).

El diagnóstico en animales se suele realizar en mataderos o en la necropsia (Kassai, 2002). La manera tradicional de diagnosticar hidatidosis en los animales es el examen post mortem en los mataderos o frigoríficos (Acha y Szyfres, 2003). Los métodos diagnósticos utilizados para diagnosticar la hidatidosis en humanos, podrían ser válidos para casos en animales, sin embargo, en la práctica de la clínica veterinaria corriente no se emplean, entre otras razones porque aun conociendo el mal, el tratamiento posible no sería viable ni técnica ni económicamente (Ramajo y Vicente, 1984).

El diagnóstico inmunológico específico es de gran utilidad cuando se trata de descartar lesiones tumorales y/o lesiones quísticas producidas por el parásito. Se efectúa a través de la detección de anticuerpos específicos de clase IgG o IgE contra el antígeno hidatídico, en el suero del paciente. Se han desarrollado

numerosas técnicas tratando de lograr una mejor Sensibilidad y Especificidad. Ninguna de las pruebas es satisfactoria individualmente y debieran utilizarse dos o más ensayos. Uno sensible pero poco específico como la hemaglutinación indirecta (HIA), con una doble difusión en gel o una inmunoelectroforesis con detección de arco 5 (DD5) como confirmación. Tienen una elevada Especificidad cuando existe el arco 5 (cerca a 98%), pero su Sensibilidad no supera el 60%. De este modo, una reacción negativa no descarta el diagnóstico. Entre las otras técnicas desarrolladas, destaca la detección de IgG e IgE mediante ELISA, con una Sensibilidad aproximada de 86% y una Especificidad de 93%. El western Blot está basado en los mismos principios que el test de ELISA con una Sensibilidad similar y una Especificidad de 96% (Muñoz, 2007).

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Ubicación.

Este trabajo se realizó en el Distrito de Puno, Provincia de Puno, Región de Puno, ubicada a 15° 44' latitud sur, 71° 31' longitud oeste del meridiano de Greenwich y una altitud de 3824 msnm (SENAMHI, 2008).

El examen post mortem de los vacunos beneficiados se realizó en el camal privado “Señor de la Agonía” ubicado en la zona del cerro Azoguine de la ciudad de Puno, y la validación serológica del Kit de ELISA con antígeno semipurificado de la zona, se realizó en el Laboratorio "ORION" de la ciudad de Puno.

3.2 Tipo de Estudio.

El presente estudio representa un estudio analítico – descriptivo de validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en vacunos.

3.3 Universo de Estudio.

El universo estuvo constituido por los vacunos beneficiados en el Camal “Señor de la agonía” de la ciudad de Puno.

3.4 Tipo de Muestreo:

El tamaño de la muestra para la evaluación de las pruebas serológicas para el diagnóstico se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: (Dawson – Saunders y Trapp, 1996).

$$n = \frac{N Z^2 (P.Q)}{(N - 1). e^2 + Z^2 (P. Q)}$$

Donde:

N = Tamaño de la población promedio que se beneficia al mes.

Z = 1.96 (valor de la distribución normal al nivel de confianza del 95%; nivel de precisión que se da a la muestra).

P = Prevalencia de la hidatidosis en Vacunos 60.7% (Venegas, 2002).

Q = Diferencia de la prevalencia de la no hidatidosis en vacunos 39.3%.

e = Error experimental al 5%.

n = Tamaño muestral.

La población de vacunos promedio beneficiados cada 15 días en el Camal Señor de la Agonía de la ciudad de Puno es de 160 según informes de beneficio de vacunos del camal de Puno - 2013.

Reemplazando en la formula tenemos:

$$N = \frac{160 \cdot 1.96^2 (60.7 \cdot 39.3)}{(160-1) \cdot 5^2 + 1.96^2 (60.7 \cdot 39.3)} = 111.38$$

- *60.7 es la Prevalencia de hidatidosis bovina obtenida en el camal municipal de Puno (Venegas, 2002).

El número de animales que se utilizaron en el presente trabajo de investigación, fue de 112 vacunos beneficiados en el lapso de 15 días, con una unidad de análisis de 8 animales por día.

3.5 Unidades de observación:

3.5.1 Unidad de investigación: estuvo constituida por la población de vacunos beneficiados en el Camal “Señor de la Agonía” de la ciudad de Puno, que fue de 112 animales que se emplearon en el presente trabajo de investigación.

3.5.2 Unidad de análisis: La unidad de análisis estuvo constituida por las muestras serológicas para la validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en vacunos.

3.6 Materiales.

3.6.1. Materiales para la obtención de muestras.

- Alcohol yodado al 3%.
- Torundas de Algodón.
- Guantes de Látex.
- Aguja hipodérmica 18G x 1.5”.
- Tubos de Ensayo Estériles x 5 ml / 10 ml / 50 ml.

- Esparadrapo.
- Material de escritorio.
- Tablero.

3.6.2. Equipo y materiales de laboratorio.

- Lector de ELISA AKLIDEX MINIREADER RS – 232.
- Espectrofotómetro (NV 203 Spectrophotometer).
- Estufa de incubación 38° C. GLOBE GERMANY – DOI A030.
- Refrigeradora LG.
- Congeladora de – 4 y –20 ° C.
- Potenciómetro (digital portátil ± 0.2 pH, rango de medición de 0.1 pH a 14 pH).
- Balanza Analítica PRECISION ES – 200A.
- Micropipetas de 5 – 50 μ l, 100 – 1000 μ l.
- Placas de microtitulación de Poliestiren fondo plano (Corning o Falcón).
- Tips de 20, 200 y 1000 μ l.
- Papel absorbente tipo toalla.
- Parafilm (tapa protectora para las placas de microtitulación).
- Pipetas Pasteur.
- Frascos de 1 litro.
- Frascos de 100 ml.
- Probetas de 100 ml y 1 litro.
- Matraz de Erlenmeyer.
- Tubos de ensayo.
- Gradillas.

3.6.1 Reactivos

- Antígeno Hidatídico.
- Anti IgG Humano marcado con Peroxidasa.
- Solución de lavado.
- Solución diluyente.
- Solución substrato.
- Sueros control negativo y positivo.
- Agua Bidestilada
- BSA (Suero de albumina bovina)
- Na_2CO_3 (Carbonato de Sodio)
- NaOH (Hidróxido de sodio)
- FOLIN – Ciocalteau.
- Tartrato de Sodio y Potasio
- Líquido de quiste hidatídico de ovino.
- Solución Tween 20
- Hipoclorito de sodio
- H_2O_2 (Peróxido de hidrógeno 30%).
- Ácido sulfúrico P.A.
- Fosfato Disódico.
- Fosfato de sodio monobásico.
- Cloruro de sodio.
- Ácido cítrico.

- Citrato de sodio.
- Agua destilada.

3.7 Metodología.

3.7.1 Obtención de muestras sanguíneas.

Para la obtención de las muestras de sangre por punción venosa fue de la siguiente forma:

- Se sujeto adecuadamente al vacuno y se realizó la identificación de la vena yugular ejerciendo presión con los dedos sobre el canal yugular en el tercio inferior del cuello, para luego realizar la limpieza de la piel con alcohol yodado al 3%.
- Luego usando una aguja 18 Gauss por 2.5 pulgadas de largo se realizó la punción percutánea para obtener sangre de la vena yugular en una cantidad aproximada de 10 ml. en un tubo de ensayo estéril de 20 ml. de capacidad debidamente rotulado.

3.7.2 Examen de órganos internos

- El examen de los órganos internos de los Vacunos después del beneficio fue en forma minuciosa, mediante la inspección, palpación y cortes del pulmón, hígado, corazón a fin de determinar en ellos la presencia de quistes hidatídicos, los mismos que fueron registrados en las fichas epidemiológicas (anexo 2), según la identificación inicial de cada uno de los animales, siendo este dato el Golden Estándar (Prueba de Oro) para la validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado.

3.7.3 Obtención del suero sanguíneo.

- Las muestras de sangre recolectada se dejaron coagular a temperatura ambiente, protegidas de la radiación solar, colocando el tubo de ensayo estéril en posición inclinada por el lapso de ½ hora.
- Luego se procedió a centrifugar a 3,500 rpm. por el lapso de 5 minutos.
- Con la ayuda de una Micropipeta se decanto el suero obtenido en viales de plástico, debidamente identificado, en una cantidad aproximada de 2 ml.
- Se cerró herméticamente los viales para su conservación por congelación (-20 °C) hasta el momento de realizar la prueba de ELISA (hasta 6 meses).

3.7.4 Obtención del antígeno semipurificado para el Kit de ELISA.

Para la obtención del antígeno semipurificado se realizó los siguientes pasos:

- Se recolecto quistes hidatídicos de los pulmones de ovinos, por tener mayor concentración de proteínas que los quistes hidatídicos bovinos.
- Luego se procedió a la extracción del líquido hidatídico, y se conservó a temperatura de refrigeración.
- Posteriormente se centrifugó el líquido hidatídico a 3500 rpm/ 30 minutos
- Se procedió a realizar la diálisis del líquido hidatídico en las membranas de diálisis con porosidad de 10 a 12 kilodaltons (kDa).

- Las membranas para diálisis se colocaron en frascos que contenían agua destilada, en una proporción de 1:4 y esta fue cambiada cada 24 horas por un lapso de 4 veces, esta se conservo a temperatura ambiente.
- Luego se retiro el líquido dializado, para posteriormente hacer la lectura en espectrofotometría y conservarlo en refrigeración.

3.7.5 Cuantificación del antígeno

La cuantificación del antígeno se realizó mediante el método de Lowry siguiendo los pasos:

- Se uso 6 tubos de ensayo, colocando agua destilada en el primer tubo.
- En el tubo 6 se colocó 20 μ l del antígeno obtenido de la diálisis del líquido hidatídico en los demás tubos de ensayo se colocaron los diversos reactivos, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Cuantificación de Antígenos (método de LOWRY)

REACTIVO	Blanco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Muestra Hidatídica
BSA 1 mg/ml (μ l)		10	20	40	80	
Muestra (μ l)						20
Agua bidestilada (μ l)	1000	990	980	960	920	980
Bufer alcalino (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Reactivo de cobre (μ l)	400	400	400	400	400	400
Dejar reposar 10 min						
Folin 1:4 (μ l)	800	800	800	800	800	800
Dejar reposar 10 minutos						
Agitar y leer en el espectrofotómetro a 700 nm						

Tabla 2. Resultados obtenidos de la lectura en espectrofotometría

resultados	Blanco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Muestra Hidatídica
1 ^{ra} lectura	0.000	0.752	0.922	1.123	1.705	0.862

2^{da} lectura	0.000	0.729	0.941	1.133	1.716	0.899
Sumatoria	0.000	1.481	1.863	2.256	3.421	1.761
Promedio	0.000	0.741	0.932	1.128	1.711	0.881

Luego se aplico la formula siguiente:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Concentración estándar}}{\text{Densidad óptica estándar}} \times \text{Densidad óptica desconocida}$$

$$\text{Concentración} = \frac{20}{0.932} \times 0.881$$

$$\text{Concentración} = 18.906 \mu\text{g}$$

Este resultado se lleva a una regla de tres simple:

$$\begin{array}{l} 20 \mu\text{l} \text{ ————— } 18.906 \mu\text{g} \\ 1 \mu\text{l} \text{ ————— } X \end{array}$$

$$X = 0.95 \mu\text{g}/ \mu\text{l} \text{ de proteínas semipurificada.}$$

Luego obtenemos la cantidad de antígeno a emplear por cada muestra:

$$\begin{array}{l} 1 \mu\text{l} \text{ ————— } 0.95 \mu\text{g} \\ X \text{ ————— } 1 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 105 \mu\text{l} \text{ de antígeno}$$

3.7.6 Sensibilización de la placa

- Se colocó 105 μl del antígeno de hidatidosis dializado en cada uno de los micropocillos, a excepción del blanco.
- Se cubrió la placa con Parafilm.

- Se incubó por el lapso de 2 horas a 38° C
- Luego se procedió a su refrigeración a 4° C por 8 horas.
- Luego de las 8 horas, se eliminó el contenido de los micropocillos de la placa y se realizó el lavado 4 veces con solución de lavado (250ul).
- Posteriormente se agregó a los micropocillos el BSA (suero de albúmina bovina) 1ug/ml, en una cantidad de 100 µl.
- Se incubó 1 hora a 38° C cubriendo la placa con Parafilm
- Pasado el tiempo se eliminó el residuo y se realizó el lavado con solución de buffer por 3 veces y se dejó secar.
- Se refrigeró entre 4 y 8° C hasta la utilización de la placa.

3.7.7 Prueba de ELISA

- Se retiró la placa impregnada con los antígenos de Hidatidosis (placa sensibilizada) y se mantuvo a T° ambiente por unos 20 minutos.
- Se añadió 198 µl de solución diluyente en cada micro pocillo.
- Luego se colocó 2 µl de los sueros controles (positivo 1 y negativos 3) y las muestras problemas en los pozos de la placa de microtitulación (fondo plano – corning), excepto en el pozo del blanco.
- Se llevó a incubación por espacio de 1 hora a 38° C.
- Posteriormente se retiró la placa y se procedió al lavado correspondiente con solución de lavado por 4 veces con 250 µl.

- Se secó por inversión sobre papel toalla.
- Se añadió a cada micropocillo 100 µl de Anti IgG humana (dilución 1/1000) en PBS-Tween, se cubrió la placa con papel Parafilm.
- Se incubó a 38 °C x 1 hora.
- Se procedió como en los pasos e y f.
- Se agregó 100 µl en cada micropocillo de la solución sustrato.
- Se incubó en la oscuridad a T° ambiente por un lapso de 20 minutos.
- Se detuvo la reacción agregando 25 µl de solución stop (Acido Sulfúrico 2.5 M) en cada micropocillo.
- Se realizo la lectura, obteniendo los siguientes valores:

Tabla 3. Lectura de densidades ópticas para el Kit de ELISA con antígeno semipurificado en el diagnostico de hidatidosis en vacunos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Blanco	0.0	0.302	0.308	0.320	0.033	0.269	0.079	0.065	0.103	0.196	0.203	0.319
B SCP	0.232	0.068	0.190	0.144	0.132	0.153	0.059	0.091	0.157	0.148	0.185	0.204
C SCN	0.068	0.119	0.084	0.080	0.063	0.077	0.090	0.060	0.171	0.123	0.344	0.271
D SCN	0.065	0.199	0.122	0.135	0.105	0.091	0.100	0.051	0.176	0.225	0.195	0.266
E SCN	0.066	0.223	0.079	0.102	0.117	0.058	0.104	0.032	0.155	0.196	0.160	0.199
F	0.109	0.094	0.181	0.172	0.173	0.185	0.077	0.047	0.127	0.194	0.193	0.304
G	0.269	0.192	0.086	0.049	0.095	0.077	0.123	0.077	0.190	0.192	0.267	0.205
H	0.351	0.290	0.118	0.033	0,060	0.118	0.284	0.140	0.239	0.262	0.108	0.053

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.123	0.087	0.123									
B	0.076	0.132	0.305									
C	0.287	0.087	0.077									
D	0.102	0.112	0.098									
E	0.064	0.276	0.105									
F	0.078	0.082										
G	0.312	0.056										
H	0.093	0.163										

Valores de la lectura con el espectrofotómetro a 470nm de longitud de onda.

El valor del punto de corte o el “cut-off” (anexo 1), fue el siguiente:

$$\text{CUT OFF} = 0.210$$

3.8 Lectura de muestras del Kit de ELISA

- La presencia o ausencia de anticuerpos se determinó relacionando la absorbancia de la muestra a 470nm respecto al valor de corte.
 - ✓ Reactivo: Muestras con absorbancias mayores al valor del punto de corte
 - ✓ No reactivo: Muestras con absorbancias menores al valor del punto de corte.

- Lectura visual:
 - ✓ Reactivo: Coloración amarilla intensa.
 - ✓ No reactivo: Muestras que no presentan coloración.

3.9 Determinación de la Sensibilidad y Especificidad.

Para determinar la Sensibilidad y Especificidad, se utilizo la siguiente tabla tetracórica según se indica.

Tabla 4. Tabla tetracórica para determinar la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA.

Tipo de prueba	+	-	Total
+	A	B	A + B
-	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	A+B+C+D

DONDE:

A: Verdaderos Positivos

B: Falsos Positivos

C: Falsos Negativos

D: Verdaderos Negativos

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Nº de verdaderos positivos (A)}}{\text{Total de enfermos (A+C)}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Nº de verdaderos negativos (D)}}{\text{Total de sanos (B+D)}} \times 100$$

$$\text{Falsos positivos} = \frac{\text{Nº de falsos positivos (B)}}{\text{Total de sanos (B+D)}} \times 100$$

Nº de falsos negativos (C)

$$\text{Falsos negativos} = \frac{\text{Nº de falsos negativos (C)}}{\text{Total de enfermos (A+C)}} \times 100$$

3.10 Determinación del Valor Diagnóstico.

Fundamento. El valor diagnóstico es igual a la proporción de aquellos pacientes que son dados positivos para la prueba y que realmente tienen la enfermedad.

$$\text{VD} = \frac{\text{A}}{\text{A + B}} \times 100$$

Donde:

A = Verdaderos Positivos

B = Falsos Positivos

3.11 Análisis Estadístico

Una vez recolectados los datos se procedió a la elaboración de los cuadros simples de frecuencia sobre las pruebas serológicas para el diagnóstico de la Hidatidosis y confirmación post mortem. Se utilizó medidas de tendencia central como el promedio y porcentajes. El método estadístico utilizado fue la prueba de Ji cuadrado χ^2 (corrección de Yates), para ello se ha utilizado las llamadas frecuencias observadas y esperadas mediante el uso de la siguiente fórmula: (Jaramillo y Martínez, 2010)

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{[(O_{ij} - E_{ij}) - 0.5]^2}{E_{ij}}$$

Donde:

- O** = Frecuencia observada.
- E** = Frecuencia esperada.
- r** = numero de filas
- k** = numero de columnas
- i** = número de categorías.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación para la validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en vacunos son:

4.1 Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad del Kit de ELISA para el Diagnóstico de Hidatidosis en Vacunos.

Tabla 5. Tabla Tetracórica para la validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado en el diagnóstico de hidatidosis en Vacunos.

PRUEBA ELISA	EXAMEN POST – MORTEM		TOTAL
	ENFERMOS Dx POSITIVO	SANOS Dx NEGATIVO	
POSITIVO	20	7	27
NEGATIVO	2	83	85
TOTAL	22	90	112

Sensibilidad 90.91%

Especificidad 92.22%

Falsos positivos 7.78%

Falsos negativos 9.10%

La tabla N° 5, muestra los datos obtenidos para la prueba de ELISA en el diagnóstico de la hidatidosis en vacunos; de un total de 112 muestras serológicas analizadas, el Kit de ELISA con antígeno semipurificado detectó 20 sueros positivos y 7 sueros negativos, considerando como falsos positivos el 7.78%, el grupo de animales sanos (sin presencia de quiste hidatídico), el Kit

de ELISA detecto 83 sueros negativos y 2 positivos, considerados como falsos negativos que representa el 9.10%.

La lectura de densidades ópticas halladas en el análisis serológico por el método de ELISA con antígeno semipurificado fueron confrontados con los resultados obtenidos al examen post mortem (22 Positivos y 90 Negativos), ambos valores fueron ingresados en la tabla tetracórica para la obtención de la Sensibilidad, Especificidad, falsos positivos, falsos negativos y valor diagnóstico de la prueba. Los métodos diagnósticos utilizados para diagnosticar la hidatidosis en humanos, no se emplean en clínica veterinaria, entre otras razones porque aun conociendo el mal, el tratamiento posible no sería viable ni técnica ni económicamente, por lo que coincidimos con Acha y Szyfres (2003); y Kassai (2002), al afirmar que el examen post mortem en los mataderos o frigoríficos el único método diagnóstico de elección (Golden Estándar) para confrontar los resultados de pruebas serodiagnósticas para la hidatidosis en vacunos.

Tizard (2009), señala que una característica que debe considerarse para interpretar los resultados de la serología, es la posibilidad de cometer errores. Los errores técnicos suelen evitarse incorporando los testigos apropiados al método de prueba. Sin embargo, existen otros que son inevitables, los falsos positivos y falsos negativos. Quiroz (2005), indica Los resultados negativos no excluyen Equinocosis ya que algunos antígenos no producen anticuerpos detectables. La respuesta inmune detectable, ha sido asociada a la localización, la integridad y la vitalidad del quiste larval, por lo que la presencia

de falsos positivos en la validación del Kit de ELISA, probablemente se deba a la unión de los anticuerpos a complejos inmunes circulantes. Morlas (2001), indica que los falsos positivos en la serología obedecen a que se dan reacciones cruzadas con otros nematodos. Por lo que la inspección post mortem como Golden estándar en el presente estudio nos permitió confirmar los animales positivos a la hidatidosis, siendo además una prueba comparativa al análisis serológico de muestras problema en nuestra investigación.

El *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ha sido el test más utilizado para la detección de antígenos circulantes en pacientes con hidatidosis, la prueba consiste en la demostración del anticuerpo presente en el suero del infectado, el cual se encuentra marcado con una enzima, la metodología es la detección de los antígenos mediante el uso de anticuerpos policlonales procedentes de un suero hiperinmune frente al líquido hidatídico, la muestra clínica en la que se trata de detectar los antígenos es habitualmente el suero, aunque en ocasiones se ha ensayado esta detección en orina o heces (Hernández, 2012) (Náquira et al., 1999), se pueden usarse anticuerpos específicos para detectar o identificar un antígeno, la detección de anticuerpos específicos en el suero permite establecer si un animal estuvo expuesto a un antígeno en especial (Tizard, 2009), tal como lo demuestra el estudio de Vargas *et al.*, (2005), quien evaluó la producción de anticuerpos policlonales de conejos, dirigido a un extracto antigénico procedente de líquido de quistes hidatídicos bovinos, aplicándolo como sustrato de sensibilización en ELISA Coproantigénica, mostrando una Sensibilidad de 64%, inferior al 90.91% obtenido en el presente estudio y una Especificidad del 100%, superior al

92.22% hallado en nuestra investigación, lo cual demuestra que los estudios que emplean muestras clínicas diferentes al suero sanguíneo tienen baja Sensibilidad pero una muy alta Especificidad, además de tener un elevado riesgo biológico por manipulación de material altamente contaminante.

Los resultados obtenidos de la tabla tetracórica (anexo 1) para la validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado, se analizaron estadísticamente, mediante la prueba de Ji cuadrado (X^2), con un nivel de significancia del 0.05, siendo el resultado obtenido significativo, esto nos indica que el Kit de ELISA con antígeno semipurificado nos permite realizar un diagnóstico eficiente de la hidatidosis en vacunos.

La validación del Kit de ELISA con antígeno semipurificado se determinó mediante la Sensibilidad y Especificidad, obteniéndose valores de 90.91% y 92.22% respectivamente, esto indica que de cada 100 animales que se sometieron al estudio, la prueba de ELISA solo detectó el 90.91% de los animales que están enfermos y 92.22% de los que están sanos, estos valores obtenidos en el presente estudio muestran una Sensibilidad y Especificidad considerables, probablemente este hecho se deba a que se está utilizando antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis mediante la prueba de ELISA con antígeno de la zona; dichos resultados son superiores a los obtenidos por Quiza (2003), quien realizó el diagnóstico de hidatidosis en vacunos mediante el test de ELISA utilizando un Kit comercial, reportando valores de 72.22% de Sensibilidad y un 82.35% de Especificidad. Rechazando parcialmente las afirmaciones de Siracusano et al. (2009); Carmena et al.

(2006); y Tawfeek et al. (2011), quienes indican que los antígenos empleados en el diagnóstico de hidatidosis como son: el líquido hidatídico (LH), mezclas antigénicas parcialmente purificadas del mismo, extractos somáticos de protoescólices y vermes adultos, productos de excreción – secreción, y extractos de oncósferas presentan problemas de reactividad cruzada y se observan disminuciones en los valores de Sensibilidad y Especificidad. El presente trabajo de investigación empleó líquido hidatídico como fuente para obtener antígeno semipurificado para realizar la validación del Kit de ELISA y se obtuvo valores de Sensibilidad y Especificidad aceptables, confirmando que el Kit de ELISA con antígeno semipurificado es un medio de diagnóstico oportuno en el animal vivo, rápido, de bajo costo y sensible. Lo que a su vez se traduce en resultados confiables desde el punto de vista de los resultados negativos. Sin embargo, las muestras positivas requieren ser sometidas a una prueba de referencia posterior.

La Sensibilidad del Kit de ELISA con antígeno semipurificado hallada en el presente trabajo de investigación fue de 90.91%, valor superior a los resultados obtenidos por: López (2003), quien reporta una Sensibilidad de 72.72% con la utilización del Kit de ELISA de uso comercial para humanos aplicado en el diagnóstico de hidatidosis en alpacas. Tito (2010), en el diagnóstico de hidatidosis ovina, mediante el método de ELISA con antígeno semipurificado halló una Sensibilidad de 82.35%. Bojórquez (2012), obtiene 86.11% de Sensibilidad en el diagnóstico de hidatidosis en alpacas empleando antígeno semipurificado en el test de ELISA. Todos estos valores de Sensibilidad son inferiores al hallado en el presente estudio, esto probablemente se deba a el

uso de Kits comerciales de uso humano para el diagnóstico de hidatidosis, así mismo se puede observar que los valores de estudios realizados con antígeno hidatídico semipurificado muestran mejor Sensibilidad para la enfermedad, puesto que favorece una mejor reacción enzimática para el diagnóstico de hidatidosis mediante el Kit de ELISA.

La Especificidad hallada con el Kit de ELISA elaborado con antígeno semipurificado, resultó un 92.22%, dicho valor resultó similar al obtenido por: Tito (2010), quien reporta una Especificidad de 92.95%, en un estudio para el diagnóstico de hidatidosis en ovinos, mediante el test de ELISA con antígeno semipurificado, dicho valor es aproximado al obtenido en el presente estudio, confirmando que el empleo de antígeno semipurificado en el diagnóstico de hidatidosis en vacunos mediante la prueba de ELISA tiene una buena Especificidad. Otro estudio realizado por López (2003), obtuvo una Especificidad de 83.64% para el diagnóstico de hidatidosis en alpacas mediante la evaluación serológica por el método de ELISA (Prueba Inmunsorbente Ligada a Enzimas) de uso comercial para humanos. Así mismo Bojórquez (2012), en un estudio de validación serológica del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en alpacas, obtuvo una Especificidad de 80.04%. Estos dos últimos resultados son inferiores a la Especificidad obtenida por el presente trabajo, esto probablemente debido a que exista reacción cruzada con otros parásitos como por ejemplo nematodos o trematodos, también debido a que el rango de Especificidad de los Kits comerciales es muy variable de acuerdo al tipo de antígeno utilizado y la especie en la que se utiliza como medio de diagnóstico.

Estudios realizados para el diagnóstico de hidatidosis humana por Denegri et al. (2002), quienes aplicaron un test de Elisa con líquido hidatídico total de ovino en 670 muestras, obteniendo una Sensibilidad del 99% y una Especificidad del 96%. Mientras que Stiglich et al. (2004), ha reportado una Sensibilidad del 88 a 96% y una Especificidad del 93% empleando Kits comerciales. De acuerdo a estos resultados se demuestra que la técnica de ELISA presenta utilidad para el diagnóstico de la hidatidosis clínica. Así mismo conocemos que el diagnóstico de hidatidosis humana mediante métodos inmunológicos ha sido una de las actividades más importantes desplegadas por los programas de lucha contra la hidatidosis en las áreas endémicas, y considerando a Puno como una zona de alta endemicidad para la hidatidosis (Rojas, 2004), es que afirmamos que el Kit de ELISA con antígeno semipurificado constituye una opción para el diagnóstico masivo de hidatidosis en vacunos por su alta Sensibilidad y Especificidad halladas en el presente estudio (90.91% y 92.22% respectivamente).

Otras pruebas diagnósticas muestran resultados inferiores a los obtenidos en nuestro estudio. Miranda (2009), realizó la evaluación de la prueba de aglutinación en látex estandarizada para el diagnóstico serológico de la echinococosis quística, empleando antígeno total de líquido liofilizado de quiste hidatídico de ovino, obteniendo una Sensibilidad de 97,5%, una Especificidad de 90,0%. Otro estudio realizado por Fuentes *et al.* (2009), caracterizó y optimizó el antígeno del líquido hidatídico de ovino y se aplicó en la prueba de látex como prueba tamiz para el diagnóstico serológico de pacientes con quistes de *E. granulosus*, reportando una Sensibilidad de 80% y una

Especificidad de 100%. Dichos resultados nos muestran una muy baja Especificidad de la prueba de western Blot frente a los resultados obtenidos en nuestro estudio, mientras los valores de Sensibilidad y Especificidad de las pruebas de aglutinación en látex son similares a los obtenidos en nuestra investigación, esto probablemente se deba a varios factores, por ejemplo los relacionados con la clínica del paciente. La influencia de alguna de estas variables clínicas sobre la serología específica en pacientes con hidatidosis, como el número de quistes, la localización de los mismos, el estadio quístico y la fecha de recogida del suero en relación a la de tratamiento. Otro de los factores que puede hacer cambiar sustancialmente la Sensibilidad de un test determinado es la composición del antígeno seleccionado.

En la actualidad la información sobre pruebas de inmunodiagnóstico en vacunos es limitada, pocos estudios se han desarrollado para caracterizar el problema de la Sensibilidad y Especificidad para la hidatidosis con el uso de antígeno purificado o semipurificado, por lo que se han desarrollado numerosas técnicas tratando de lograr una mejor Sensibilidad y Especificidad. Ninguna de las pruebas es satisfactoria individualmente y debieran utilizarse dos o más ensayos (Muñoz, 2007), las pruebas serológicas permiten un diagnóstico específico, pero para que tengan algún valor se requiere de una reacción antígeno/anticuerpo, lo cual requiere de una capacidad de respuesta inmunológica del huésped y del contacto de este sistema inmunocompetente con los antígenos, ninguna de las técnicas permite por sí sola el diagnóstico de certeza por lo que Vera et al. (2003) recomienda asociarse al menos dos de ellas; sin embargo los resultados obtenidos en nuestra investigación mediante

el Kit de ELISA con antígeno semipurificado nos permite afirmar la validez de su utilización para realizar encuestas epidemiológicas amplias con bajo costo, aplicado a programas de control de la hidatidosis en vacunos.

En cuanto a la investigación de nuevos antígenos para mejorar la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA, Hernández (2012), indica que se han llevado a cabo numerosos trabajos tratando de mejorar la Sensibilidad, y también la Especificidad de este tipo de pruebas indirectas. Algunos se han centrado en la comparación de diferentes técnicas, otros en la detección de inmunoglobulinas diferentes y otros estudios en el uso de distintos antígenos, Carmena et al. (2006), Afirma que los antígenos que se han utilizado son principalmente el líquido hidatídico (LH) o mezclas antigénicas parcialmente purificadas del mismo, y ocasionalmente se han probado otras fuentes como extractos somáticos de protoescolices y vermes adultos, productos de excreción – secreción, y extractos de oncósferas. Vera (2003), reporta que el examen de Elisa Inmunoglobulina G, es un examen que ha logrado desplazar a los anteriores debido a su Sensibilidad de un 93% y valor predictivo positivo elevado, los falsos positivos fueron inferiores al 3%. Los resultados obtenidos en nuestra investigación son aproximados a estos valores reportados, siendo el Kit de Elisa con antígeno semipurificado una opción para el diagnóstico masivo de hidatidosis en vacunos.

La técnica de Elisa aplicada al presente trabajo de investigación nos permitió validar el uso de proteína semipurificada en el diagnóstico de hidatidosis en vacunos, obteniendo una Sensibilidad de 90.91% y una Especificidad de

92.22%, esto se debe probablemente a que la respuesta inmunitaria en hospederos intermediarios como el vacuno esta dado por el liquido hidatídico, que consiste en una mezcla compleja de glicoproteínas y lipoproteínas, carbohidratos y sales, estando de acuerdo con lo que indican Carmena et al., (2006); y Rogan et al. (2006), por lo tanto el liquido hidatídico es la principal fuente de antígenos utilizada para el diagnostico primario de la enfermedad (Ortona et al., 2003), siendo el diagnostico inmunológico por el método de ELISA de gran valor, mediante la detección de anticuerpos circulantes contra los antígenos de la fase larval del parasito (Leto y Ponce, 2006), por lo tanto la metodología de ELISA utilizada en el presente estudio podría ser aplicado en programas de control de la hidatidosis en Vacunos.

Tabla 6. Valores de densidad óptica para el diagnóstico de la hidatidosis en vacunos mediante el Kit de ELISA con antígeno semipurificado.

Condición del Kit de ELISA	Nº muestras	Valores extremos de densidad óptica ELISA
Positivos.	20	0.225 – 0.351
Negativos.	83	0.032 – 0.205
Falsos positivos	7	0.077 – 0.155
Falsos negativos	2	0.223 – 0.266
Control positivo.	---	0.232
Control negativo.	a.	0.068
	b.	0.065
	c.	0.066
Total	112	

La tabla N° 6 muestra los valores de la densidad óptica para el diagnóstico de la hidatidosis en vacunos mediante el Kit el ELISA con antígeno semipurificado, a la lectura de 112 muestras serológicas, se obtuvo densidades ópticas de 0.232 para el suero control positivo, de 0.068, 0.065 y 0.066 para los sueros controles negativos, hallando rangos de 0.225 a 0.351 para los verdaderos positivos y rangos de 0.032 a 0.205 para los verdaderos negativos; así mismo los rangos hallados para los falsos positivos fueron de 0.077 a 0.155 y en los falsos negativos los rangos fueron de 0.223 a 0.266.

El punto de corte o cut – off para el presente trabajo de investigación fue obtenido por el promedio de los sueros negativos + 2 desviaciones estándar, el valor hallado fue de 0.210 y se consideraron como positivos aquellos sueros que presentaron valores de densidad óptica por encima del cut – off. Santillan, (2002), indica que el valor de corte es igual a la media más 3 desvíos estándar (los valores de corte del ELISA para hidatidosis pueden variar desde +2DS hasta +8 DS), con un valor de corte igual a una densidad óptica de 0.260. En el estudio realizado por Gorman *et al.*, (2000), consideraron como positivos a aquéllos sueros cuyas DO fueran mayores al doble de las DO promedio de los 3 controles negativos (cut – off) y los sueros que arrojaron una DO bajo ese valor de densidad fueron considerados como negativos. Flores y Rodríguez (2006) describen una prueba cualitativa por ELISA para el inmunodiagnóstico de hidatidosis humana, determinando el valor del cut – off con la media de 3 controles negativos más 3 desviaciones estándar, a diferencia del presente trabajo de investigación, que se obtuvo el cut – off con 2DS de 0.210, que fue usado para determinar los verdaderos positivos y verdaderos negativos, como se muestra en la tabla N° 6.

Gorman *et al.*, (2000), realizo la lectura de densidades ópticas a una longitud de onda de 492nm, para la prueba de ELISA con antígeno semipurificado. Mientras que el Instituto Nacional de Salud (2002), recomienda la lectura de muestras a 490 nm respecto al valor de corte. En el presente trabajo se realizo la lectura de densidades ópticas de las muestras serológicas a una longitud de onda de 470 nm, no existiendo diferencia en cuanto a los resultados esperados.

4.2 Valor Diagnostico del Kit de ELISA para el Diagnostico de Hidatidosis en Vacunos.

$$VD = \frac{20}{27} \times 100$$

$$VD = 74.07\%$$

El valor diagnóstico hallado en el presente trabajo de investigación, representa ser igual a la proporción de aquellos pacientes que son dados positivos para la prueba y que realmente tienen la enfermedad, el valor diagnostico hallado es igual a la proporción de vacunos con la enfermedad dando un resultado positivo expresado porcentualmente, así tenemos que el valor diagnostico obtenido en el presente trabajo fue de 74.07%, esto quiere decir, que de 100 vacunos verdaderamente positivos a la hidatidosis, el Kit de ELISA con antígeno semipurificado solo confirmo 74 vacunos positivos a la hidatidosis. Por lo tanto el valor diagnostico de la prueba de ELISA con antígeno semipurificado muestra variaciones de acuerdo a la zona de estudio y las condiciones de

manejo en la crianza de vacunos, puesto que el valor diagnóstico no mensura reacciones cruzadas con otras parasitosis, tampoco la respuesta inmune de los vacunos frente a la hidatidosis, indicándonos que de los vacunos que verdaderamente tienen la enfermedad esta prueba serológica detecta el 74.07%.

V. CONCLUSIONES.

En el diagnóstico de hidatidosis en vacunos a través de la evaluación serológica del Kit de ELISA elaborado con antígeno semipurificado, se llegó a las siguientes conclusiones:

- La Sensibilidad del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en vacunos fue de 90.91%.
- La Especificidad del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en vacunos fue de 92.22%.
- El Valor Diagnóstico del Kit de ELISA con antígeno semipurificado fue de 74.07%.

VI. RECOMENDACIONES.

- Realizar pruebas con antígeno purificado de la zona en la validación del Kit de ELISA para el diagnóstico de hidatidosis bovina.
- Realizar una evaluación sistemática de antígeno de líquido hidatídico, teniendo en cuenta las variables que puedan afectar a la positividad serodiagnóstico de los pacientes con hidatidosis.

VII. REFERENCIAS DE LITERATURA.

- Acha, P. y B. Szyfres. 2003 Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3ra Ed. Editorial Organización Panamericana de la Salud. Washington.
- Barriga, O. 2002. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Editorial Germinal. Santiago de Chile.
- Bojórquez, R. 2012 Validación serológica del Kit de ELISA con antígeno semipurificado para el diagnóstico de hidatidosis en alpacas (Vicugna pacos) Tesis Para Optar El Título De Médico Veterinario Y Zootecnista, FMVZ UNAP.
- Budke, C., P. Deplazes y P. Torgerson. 2006. Global socioeconomic impact of cystic Echinococcosis. Emerging infectious diseases. University of Zurich. Switzerland.
- Bustinza, V. 2001. La Alpaca, Conocimiento del Potencial Andino, copyright © por oficina de recursos del aprendizaje sección publicaciones UNA Puno.
- Carmena D., A. Benito y E. Eraso. 2006. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. Acta Tropica. Department of Immunology, Microbiology and Parasitology. University of the Basque Country. Vitoria – España.

- Carmena D., A. Benito y E. Eraso. 2007. Recent advances in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. MRC Clinical Sciences Centre. Faculty of Medicine. Imperial College. London – UK.
- Cordero del Campillo, M., F. Rojo, A. Martínez, M. Sánchez, S. Hernández, I. Navarrete, P. Diez, H. Quiroz y M. Carvalho. 1999. *Parasitología Veterinaria*. 1ra Ed. Editorial Interamericana. Madrid – España.
- Correa, S., C. Culqui, M. Pinto, L. Huilca y E. Salinas. 2000. Hidatidosis Hepática: Revisión De Casos Intervenidos Quirúrgicamente En El Hospital Militar Central. *Rev. De Gastroent Del Perú*.
- Dawson – Saunders, B. y R. Trapp. 1996. *Bioestadística Médica*. 2ª ed. Editorial el Manual Moderno. México.
- Denegri, M., C. Elissondo y M. Dopchiz. 2002. *Situación de la Hidatidosis-Echinococcosis en la República Argentina* Editorial Martín.
- Drugueri L. 2002 Equinococosis. [Internet], [15 agosto 2007]. Disponible en: <http://www.zoetecnocampo.com/foro/Forum4/HTML/000013.html>
- Dueger, E. y R. Gilman. 2001. Prevalence, intensity and fertility of ovine echinococcosis in the central Peruvian Andes. *Transactions of the royal societ of tropical medicine and hygiene*.

- Eckert, J. y P. Deplazes. 2004. Biological, Epidemiological and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical microbiology reviews*.
- Flores, A. y P. Rodríguez. 2006. Estandarización De La Prueba De Elisa Para El Inmunodiagnóstico De Hidatidosis Humana Empleando Antígenos De Producción Local, Lab. De Inmunología - Sedilab (Fac. Medicina – Universidad Mayor de San Simon), *Gac Med Bol* V.29 N.1 Cochabamba
- Frisancho, D. 1993. *Patología y Cirugía en altura*. Editorial Mejía Baca. Lima – Perú.
- Fuentes, F., N. Incio, J. Lévano y Y. Torres. 2009. Caracterización Y Optimización Del Antígeno Del Líquido Hidatídico De Ovino Y Su Aplicación En La Prueba De Látex, *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 26(4): 473-77.
- Gonzales, I., M. Diaz, F. Nuñez y O. Gonzales. 2001. Infección por *Echinococcus granulosus* (quiste hidatídico). Reporte de un caso. *Rev cubana Med Trop*.
- Gorman, T., C. López, F. Fredes y H. Alcaíno. 2000. Monitoreo Inmunológico Del Éxito Terapéutico En Fasciolosis Ovina Empleando Un Antígeno Semipurificado De < 30 Kda. *Parasitol Al Día*; 24: 27-34.

- Gottstein, A. y A. Hemphill. 1997. Immunopathogenetic aspects of disease induced by helminth parasites. *Inmuno pathology of echinococcosis.*
- Hernández, A. 2012. Validación de un nuevo antígeno recombinante para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con Hidatidosis, y su aplicación a un test comercial – Tesis Doctoral – universidad de Salamanca – España.
- Holeman, B. y D. Heath. 1997. The early stages of *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigen. *Int J Parasitol.*
- Huenece, O. 1995. Hidatidosis Pulmonar y Hepática en Pacientes Pediátricos. Facultad de Medicina Humana. UNA – Puno.
- INS. 2002. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de zoonosis parasitarias. Lima – Perú.
- Jaramillo, C. Y Martínez, J. 2010 *Epidemiología Veterinaria*, Por Editorial El Manual Moderno, S.A. De C.V. México.
- Jubb, K., P. Kennedy y N. Palmer. 1990. *Patología de los Animales Domésticos*. 3ra Ed. Editorial Hemisferio Sur. Uruguay.
- Junquera, J., S. Esquena, R. Martos, C. Ramirez, C. Salvador, A. Celma, E. Trilla, I. De Torres y J. Morote. 2005. Quiste Hidatídico Renal simulando Hipernefroma. *Actas Urol Esp.*

Kassai, T. 2002. Helminthología Veterinaria. 1ª Edición. Editorial Acribia Zaragoza – España. 149, 155, 296.

Kose, M. y F. Kirkali. 2008. Prevalence of cystic Echinococcosis in slaughtered cattle in Afyonkarahisar. Turkish Society for Parasitology.

Larrieu, E. 2000. Equinococosis Quística, Epidemiología Y Control En América Del Sur. Art. Rev. Med. Parasitol.
<http://biblat.unam.mx/en/revista/parasitologia-latinoamericana>

Larrieu, E., B. Frider, M. del Carpio, J. Salviti, C. Mercapide, R. Pereyra, M. Costa, M. Odriozola, A. Perez, G. Cantoni y J. Sustersic. 2000. Portadores asintomáticos de Hidatidosis: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. Revista Panamericana de Salud Pública.

Larrieu, E., M. Costa, M. del Carpio, S. Moguillansky, G. Bianchi y Z. Yadon. 2002. A case – control study of the risk factor for cystic echinococcosis among children of Rio Negro province, Argentina. Ann. Trop. Med. Parasitol.

Larrieu, E., A. Belloto, P. Arambulo y H. Tamayo. 2004. Echinococcosis quística: epidemiología y control en América del sur. Parasitol Latinoam.

- Leto, R. y V. Ponce. 2006. Aspectos Clínicos Y Terapéuticos De La Enfermedad Hidatídica. Rev. Post De La VI Cátedra De Medicina. http://congreso.med.unne.edu.ar/revista/revista159/3_159.pdf
- Lightowlers, M., W. Lawrence, B. Gauci, C. Young, J. Ralston, M. Maas y D. Heath. 2006. Vaccination Against Hydatidosis Using A Defined Recombinant Antigen. *Parasite Immunol.* 18:457-462.
- Lloyd, J. 2001. Hidatidosis - Universidad Nacional Del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, Carrera: Licenciatura En Biología, Art. Científico.
- Lopez, R. 2003. Evaluación serológica por el método de ELISA y DD5 en el diagnostico de la hidatidosis en alpacas (*Lama pacos*). Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista, FMVZ – UNAP.
- Lorenzo C., H. Ferreira, K. Monteiro, M. Rosenzvit, L. Kamenetzky, H. Garcia, Y. Vásquez, C. Naquira, E. Sanchez, M. Lorca, M. Contreras, J. Last y G. González – Sapienza. 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*.
- Mackey, J. 1973. Enfermedades de los bovinos en corrales de engorde. Editorial Latino América. 1ra Ed. México.

- McManus, D., W. Zhang, J. Li y P. Bartley. 2003. Echinococcosis. Molecular Parasitology Laboratory. Australian Centre of International and Tropical Health and Nutrition. The Lancet. Australia.
- Mehlhorn, H., D. Duwel y W. Raether. 1993. Manual De Parasitología Veterinaria Editorial Grass – Iatros; Bogotá, Colombia.
- Men, S., B. Hekimoglu, C. Yucesoy, I. Arda y I. Baran. 1999. Percutaneous treatment of hepatic hydatid cysts: an alternative to surgery. Am J Roentgenol 1999; 172:83-9.
- Miranda, E. 2009. Evaluación De Una Prueba De Aglutinación De Látex Para El Diagnóstico Serológico De La Equinococosis Quística. Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública, Vol. 26, Núm. 2, Pp. 198-202 Instituto Nacional De Salud (Perú).
- Morlas, C. 2001. Una zoonosis de múltiples presentaciones clínicas <http://repository.unimilitar.edu.co/xmlui/bitstream/handle/10654/8004/HidatidosisUnazonosis2001.pdf?sequence=1>.
- Moro, P., N. Bonifacio, R. Gilman, L. Lopera, B. Silva y R. Tokumoto. 1999. Field diagnosis of echinococcosis granulosis infection among intermediate and definitive hosts in an endemic focus of human cystic echinococcosis. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.

- Moro, P. y P. Schantz. 2006. Cystic echinococcosis in the americas. Parasitology Internacional.
- Muñoz, P. 2007. Diagnóstico Y Tratamiento De La Hidatidosis Hospital Militar Del General Luis Felipe Brieba Arán, Universidad De Los Andes Rev Chil Infect 2007; 24 (2): 153-154
- Náquira, C. 1999. The Basis Of The Strategy For Control Of Foodborne Trematode Infections - Instituto De Medicina Tropical Daniel A. Carrion, Universidad Nacional Mayor De San Marcos Lima Perú.
- Noé, G 2003. Expresión Y Caracterización De La Malato - Deshidrogenasa Mitocondrial Del Helminto Parásito *Echinococcus Granulosus*. Tesis De Licenciatura En Biotecnología. Universidad Nacional De Gral. San Martín Escuela De Ciencia Y Tecnología. Buenos Aires – Argentina.
- OIE. 2004. Oficina Internacional de Epizootias. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 5ta Edición. <http://www.oie.int/doc/ged/D6508.PDF>
- Ortona E., R. Rigano, B. Buttari, F. Delunardo, S. Ioppolo, P. Margutti, E. Profumo, A. Teggi, S. Vaccari y A. Siracusano. 2003. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. Acta Tropica.

- Quiroz, H. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Edit. Limusa D. F., México.
- Quiza, H. 2003. Evaluación Serológica por el método de ELISA y doble difusión del arco 5 en el diagnostico de Hidatidosis Bovina. Tesis FMVZ – UNA PUNO.
- Ramajo, M. y S. Vicente. 1984. Cenurosis e Hidatidosis. El perro como principal reservorio. 1ra Ed. Instituto de recursos naturales y agrobiología. http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/tecnologia/cenurosis_e_hidatidosis.pdf
- Ramírez, A. 1998. Diagnóstico de control de enfermedades en camélidos sudamericanos. Publicación técnica de la facultad de medicina veterinaria. UNMSM. Lima – Perú.
- Ramos, C. 2006. Hallazgos terapéuticos de la enfermedad hidatídica. Rev. Postgrado – Argentina.
- Ramzy, R., H. Helmy, E. Zayyat, M. Rifaat, H. Abdel, y M. Abdel-Baki. 1999. ELISA para la detección de anticuerpos IgG1 específicos de equinocosis quística humana en Egipto. Trop. Med. Int. Health. 4: 616-620.

Rogan, M., W. Hai, R. Richardson, E. Zeyhle y P. Craig. 2006. Hydatid cysts: does every picture tell a story? Trends in Parasitology.

Rojas, M. 2004. Nosoparasitosis de los Rumiantes Domésticos peruanos. 2da Ed. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Ruiz, Ch. 2001. Tumoraciones del Hígado. [Internet], http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/medicina/cirugia/tomo_i/cap_1_9-1_h%C3%ADgado.htm

Sánchez, C. 2002. Pequeños Rumiantes. Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Departamento de patología animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España.

SENAMHI. 2008. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. <http://www.senamhi.gob.pe/>

SENASA. 2008. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. <http://www.senasa.gob.pe/>

Santillan, G. 2002. Diagnóstico inmunológico de la Hidatidosis – JORNADAS NACIONALES DE HIDATIDOSIS argentina <http://cni.inta.gov.ar/helminto/pdf%20hidatidosis/catamarca1.htm>

- Shehabi, F., S. Kamhawi, P. Schantz, P. Craig y S. Abdel-Hafez. 2000. Diagnosis Of Canine Echinococcosis: Comparison Of Coproantigen Detection With Necropsy In Stray Dogs And Red Foxes From Northern Jordan. *Parasite*, 7:83-90.
- Siracusano A., A. Teggi y E. Ortona. 2009. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*
- Stiglich, M., L. Vega – Briceño, M. Gutierrez, P. Trefogli, y P. Chiarella. 2004. Hidatidosis pulmonar pediátrica: reporte de 12 años de experiencia. *Rev. Chilena de Pediatría*.
- Soulsby, E. 1987. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias En Los Animales Domésticos - 7ma. Ed.* Nueva Editorial Interamericana S.A. De C.V. México.
- Tawfeek G.,H. Elwakil, L. El-Hoseiny, H. Thabet, R. Sarhan, N. Awad y W. Anwar. 2011. Comparative analysis of the diagnostic performance of crude sheep hydatid cyst fluid, purified antigen B and its subunit (12 Kda), assessed by ELISA, in the diagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology Research*.

- Tito, R. 2010. Validación De La Prueba Del Kit Elisa Con Antígeno Semipurificado De La Zona En El Diagnóstico De Hidatidosis En Ovinos En La Provincia De Melgar – Ayaviri. Tesis Para Optar El Título De Médico Veterinario Y Zootecnista, FMVZ – UNAP.
- Tizard, R. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8va Edición D.F. Interamericana. México.
- Torgerson, P. 2003. Economic effects of Echinococcosis. Acta Tropica.
- Urquhart, G., J. Armour y L. Duncan. 2001. Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia. España.
- Vargas, D., R. Bonet, C. Jofré y S. Campano. 2005. Evaluación Del Líquido Hidatídico Como Sustrato De Sensibilización En La Obtención De Anticuerpos Policlonales De Uso En Elisa Coproantigénica. Parasitol Latinoam.
- Venegas, H. 2002. Prevalencia De La Hidatidosis Y Fertilidad De Quistes Hidatídicos En Vacunos Beneficiados En El Camal Municipal De Puno. Para Optar El Título De Médico Veterinario Y Zootecnista, Tesis De Pre-Grado FMVZ. – UNAP.

Vera, G., F. Venturelli, J. Ramírez y A. Venturelli. 2003. Hidatidosis Humana, Servicio De Cirugía, Hospital Clínico Regional De Valdivia. Instituto De Cirugía, Facultad De Medicina, Universidad Austral De Chile

Vera, F. 2003. Hidatidosis Humana – Área Hospitalaria N° 1 Rev. Cirugía. Lima – Perú.

Zhang, W., J. Li y D. McManus. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clinical Microbiology Reviews.

ANEXOS

ANEXO 1.

Tabla 7. Punto de corte para el diagnostico de hidatidosis Bovina
mediante el Kit de ELISA con antígeno semipurificado.

Muestra	Densidad optica	D.S.	D.C.	PROD
f	X	X – P.S.	(X – P.S.) ²	f(X – P.S.) ²
SCP	0.232	0.12445	0.01549	0.01549
SCN	0.068	-0.03975	0.00158	0.00158
SCN	0.065	-0.04275	0.00183	0.00183
SCN	0.066	-0.04175	0.00174	0.00174
S	0.431			0.02064
P.S.	0.10775			

- Donde:
- X = promedio
 - f = casos
 - S = sumatoria
 - P.S. = promedio de la sumatoria
 - D.S. = desviación simple
 - D.C. = desviación cuadrática
 - PROD= producto
 - S² = varianza
 - D.E. = desviación estándar
 - V.C. = valor de corte
 - S.C.P = suero control positivo
 - S.C.N = suero control negativo
 - P.C.N = promedio de controles negativos

Hallamos la varianza:

$$S^2 = \frac{\text{SUM } f * (X-X)^2}{f}$$

$$S^2 = \frac{0.02064}{4} = 0.00516$$

Luego hallamos la desviación estándar:

$$D.E. = \sqrt{S^2}$$

$$D.E. = \sqrt{0.00516}$$

$$D.E. = 0.07813$$

Luego hallamos el valor de corte en la siguiente fórmula:

$$V.C. = P.C.N + 2 D.E.$$

$$V.C. = 0.06663 + 2 (0.07813)$$

$$V.C. = 0.210$$

Calculo de valores de sensibilidad, especificidad, falsos positivos y falsos negativos del Kit de ELISA con antígeno semipurificado

$$\text{Sensibilidad} = \frac{20}{22} \times 100 = 90.91 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{83}{90} \times 100 = 92.22 \%$$

$$\text{Falsos positivos} = \frac{7}{90} \times 100 = 7.78 \%$$

$$\text{Falsos negativos} = \frac{2}{22} \times 100 = 9.10 \%$$

Tabla 8. Prueba de X² para la prueba de ELISA con antígeno semipurificado

Obtención de Valores Esperados, Prueba X ²					
ELISA HIDATIDOSIS ALPACAS	Enfermos Dx Negativo		Sanos Dx Positivo		Total
	θ_i	e_i	θ_i	e_i	
Positivos	20	5.3	7	21.7	27
Negativos	2	16.7	83	68.3	85
Total	22		90		112

$$e_i = \frac{22 \cdot 27}{112} = 5.3$$

$$e_i = \frac{90 \cdot 27}{112} = 21.7$$

$$e_i = \frac{22 \cdot 85}{112} = 16.7$$

$$e_i = \frac{90 \cdot 85}{112} = 68.3$$

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} = \frac{(20-5.3)^2}{5.3} + \frac{(2-16.7)^2}{16.7} + \frac{(7-21.7)^2}{21.7} + \frac{(83-68.3)^2}{68.3}$$

$\chi^2_c = 66.777$

La corrección de Yates se aplica a la prueba de Ji – cuadrado cuando al menos el valor de una frecuencia esperada es menor que 5.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{[(O_{ij} - E_{ij}) - 0.5]^2}{E_{ij}} = \frac{[(20-5.3)-0.5]^2}{5.3} + \frac{[(2-16.7)-0.5]^2}{16.7} + \frac{[(7-21.7)-0.5]^2}{21.7} + \frac{[(83-68.3)-0.5]^2}{68.3}$$

$\chi^2_c = 62.311$

- GL = (C-1)(F-1)
- GL = (2-1)(2-1)
- GL = (1)(1)
- GL = 1

Resumen Prueba χ^2	
Grados de libertad.	1
Significancia.	P > 0.05
Nivel de Significancia.	3.84
Prueba de Ji ²	66.777

Tabla E distribución Chi-cuadrada													
GL	Probabilidad de un valor más alto de Chi-cuadrado												
	0.995	0.99	0.975	0.95	0.90	0.75	0.50	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.102	0.455	1.320	2.710	3.840	5.020	6.630	7.880
2	0.010	0.020	0.051	0.103	0.211	0.575	1.390	2.770	4.610	5.990	7.380	9.210	10.600
3	0.072	0.115	0.216	0.352	0.584	1.210	2.370	4.110	6.250	7.810	9.350	11.300	12.800
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.060	1.920	3.360	5.390	7.780	9.490	11.100	13.300	14.900
5	0.412	0.554	0.831	1.150	1.610	2.670	4.350	6.360	8.240	11.100	12.800	15.100	16.700

ANEXO 2.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

FICHA EPIDEMIOLOGICA

FICHA Nº:

ESPECIE ANIMAL: EDAD:

SEXO: RAZA:

TOMA DE MUESTRA SANGUINEA EN ml. :

EXAMEN DE ORGANOS INTERNOS:

CORAZON:

HIGADO:

PULMONES:

PRUEBA DE LABORATORIO:

TEST DE ELISA (POSITIVO):

TEST DE ELISA (NEGATIVO):

FECHA:/...../.....

.....

Firma del responsable

Foto 1. Camal municipal del distrito de Ilave.



Foto 2. Quistes Hidatídicos de Ovino. Camal municipal del distrito de Ilave

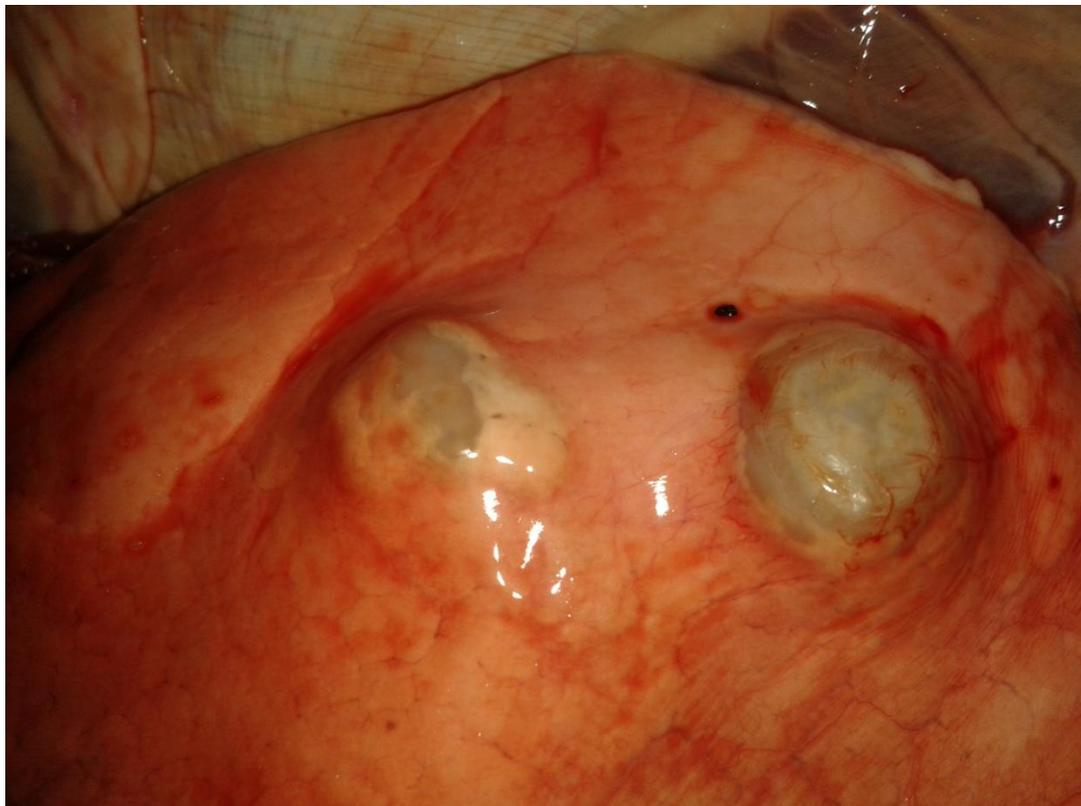


Foto 3. Obtención de antígeno de líquido hidatídico de Ovino.

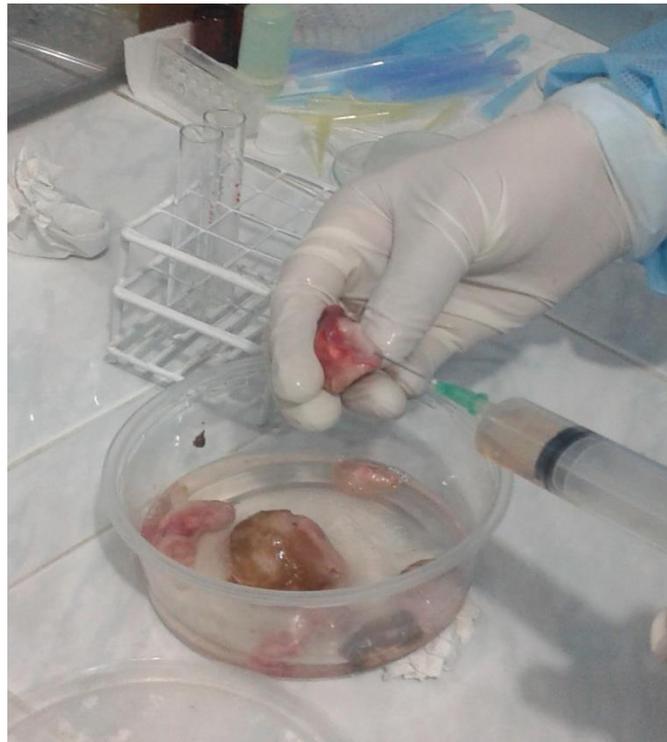


Foto 4. Kit de ELISA con antígeno semipurificado (muestras 1 - 91)

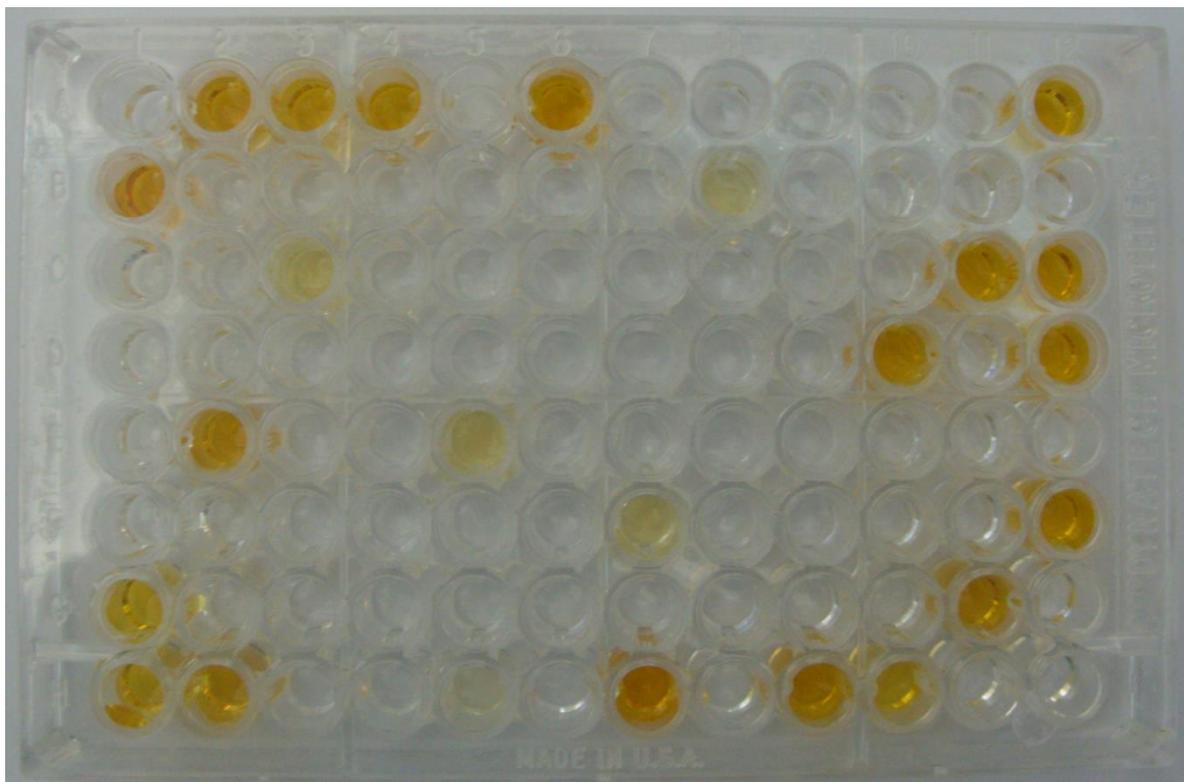


Foto 4. Kit de ELISA con antígeno semipurificado (muestras 92 - 112)

