

EQUINOCOCOSIS (INFECCIÓN POR *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* Y POR *E. MULTILOCULARIS*)

RESUMEN

La equinococosis quística humana, causada por *Echinococcus granulosus*, y la equinococosis alveolar, causada por *E. multilocularis*, suponen importantes amenazas para la salud pública en muchas partes del mundo. El diagnóstico de la equinococosis en los perros u otros carnívoros susceptibles se basa en la detección de los cestodos del género *Echinococcus* o de sus huevos en sus heces o en el intestino delgado. Las pruebas de coproantígeno y copro-ADN han resultado útiles para el diagnóstico seguro, rápido y preciso. En los hospedadores intermediarios, el diagnóstico depende de la detección post-mortem de la forma larvaria quística que puede infectar casi cualquier órgano, y en particular el hígado y los pulmones, con la posterior confirmación de especie mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Identificación del agente: Hasta ahora, desde el punto de vista taxonómico se consideraban válidas cinco especies del género *Echinococcus*. Sin embargo, en la actualidad, según los datos biológicos y epidemiológicos y, sobre todo, según los datos del genotipado molecular, se recomienda incluir en este género al menos nueve especies. Todas las especies de *Echinococcus* que causan equinococosis quística en el hospedador intermediario pueden denominarse *E. granulosus* en sentido amplio, mientras que las cepas G1-G3 (que están estrechamente relacionadas) actualmente se denominan *E. granulosus* en sentido estricto. Está ampliamente aceptado que dentro de *E. granulosus* s.l., *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) y *E. canadensis* (G6, G7, G8, G10) deben considerarse especies diferenciadas, aunque sigue existiendo cierto debate respecto a si *E. canadensis* representa a más de una especie. Habitualmente las formas larvianas de *Echinococcus* se pueden detectar visualmente en los órganos. Se debe proceder con especial cautela para realizar un diagnóstico específico *E. granulosus* en los casos en los que las ovejas también presenten infestación por *Taenia hydatigena*. El examen histológico puede confirmar el diagnóstico después de que el material fijado con formalina se procese mediante los métodos convencionales de tinción. La presencia de una capa laminada acelular, positiva a la tinción de ácido periódico de Schiff, con o sin una membrana germinal nucleada y celular interna, puede considerarse una característica específica de los metacestodos de *Echinococcus*. El genotipado es el único método disponible para confirmar la especie exacta de *Echinococcus* que está infectando a los animales. La detección de larvas de *E. multilocularis* en los roedores y en otros hospedadores es posible mediante el examen macroscópico o microscópico y se confirma mediante la detección del ADN empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la necropsia se utiliza el intestino delgado para detectar la forma adulta de *Echinococcus* spp. en carnívoros salvajes o domésticos. La manipulación del material infectado debe realizarse con precauciones de seguridad específicas para evitar el riesgo de que el operario contraiga la enfermedad, que puede resultar fatal.

Pruebas de coproantígenos o CoproDNA: Se están consiguiendo avances considerables en el desarrollo de las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de las infecciones intestinales por *Echinococcus* utilizando métodos de detección de coproantígenos. Esta técnica se ha utilizado con éxito en los estudios de *E. granulosus* en perros y actualmente se está empleando en el estudio de *E. multilocularis* en poblaciones de perros y zorros de zonas muy endémicas. La detección de los coproantígeno es posible en muestras fecales recogidas de animales vivos o muertos o procedentes del medio ambiente. Sin embargo, puesto que estas pruebas se desarrollaron en base a proteínas de gusano adulto, pueden surgir falsos positivos, sobre todo en zonas poco

endémicas. Se han validado como técnicas definitivas métodos de detección de ADN mediante PCR para la detección de *E. multilocularis* y, más recientemente, de *E. granulosus* en hospedadores definitivos.

Pruebas serológicas: Se pueden detectar los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de las oncosferas, líquido quístico y protoescolices en el suero de las ovejas y de los perros infectados, pero, hoy en día, este sistema tiene una utilidad práctica escasa, ya que no sirve para diferenciar entre las infecciones actuales y las previas. Asimismo, tiene poca sensibilidad en los casos de baja carga parasitaria. También puede haber una reacción cruzada entre especies de *Echinococcus* y de *Taenia*.

Requisitos para las vacunas: Se han logrado avances excelentes en la elaboración de una vacuna eficaz (EG95) contra la infección de ovejas y ganado vacuno por larvas de *E. granulosus*.

A. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Echinococcus* consisten en pequeñas (1–11 mm de longitud) tenias de carnívoros cuya fase larvaria (metacestodos) se denomina hidátide, que proliferan de forma asexual en distintos mamíferos, incluido el hombre.

Hasta hace poco se aceptaba que en este género había cinco especies morfológicamente bien diferenciadas: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthra*, *E. vogeli* y *E. shiquicus*. *Echinococcus granulosus*, anteriormente considerada una especie única con una gran diversidad genotípica y fenotípica, ahora está reconocida como conjunto de especies crípticas, que difieren considerablemente entre sí en cuanto a morfología, desarrollo y especificidad de hospedador (incluida la infectividad o patogenicidad para el ser humano). Esta diversidad se refleja en los genomas mitocondrial y nuclear. De acuerdo con los caracteres fenotípicos y las secuencias génicas, actualmente *E. granulosus* (en sentido amplio) se subclasifica en *E. granulosus* (en sentido estricto) (incluidas las variantes genotípicas G1-3 identificadas anteriormente), *E. felidis* (anteriormente la “cepa del león”), *Echinococcus equinus* (la “cepa del caballo”, genotipo G4), *E. ortleppi* (la “cepa del ganado vacuno”, genotipo G5) y *E. canadensis*. Esta última especie, tal como se reconoce aquí, es la que presenta la máxima diversidad y está formada por la “cepa del camello”, genotipo G6, la “cepa del cerdo”, genotipo G7, y dos “cepas de cérvido”, genotipos G8 y G10 (Nakao *et al.*, 2013; Romig *et al.*, 2015). Varios autores consideran que las cepas G6 y G7 deben denominarse *E. intermedius*. *Echinococcus granulosus* (en sentido amplio) tiene una distribución mundial; *E. multilocularis* se encuentra en zonas amplias del hemisferio norte, *E. shiquicus* se encuentra en la República Popular de China y *E. oligarthra* y *E. vogeli* están confinadas a Centroamérica y Sudamérica. Las cinco especies descritas inicialmente son infectivas en el hombre y causan varias formas de equinocosis, aunque en la clasificación taxonómica más reciente no hay pruebas de infecciones por *E. equinus* en el ser humano. La equinocosis quística humana, causada por *E. granulosus*, y la equinocosis alveolar, causada por *E. multilocularis*, se consideran como una amenaza importante para la salud pública en muchas partes del mundo (OMS/OIE, 2001) causada por la ingesta de huevos derivados directamente o indirectamente de hospedadores definitivos. Las muestras clínicas y los huevos de *Echinococcus* spp. Deben manipularse aplicando las medidas de bioseguridad y contención adecuadas, que vienen determinadas por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4, *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

Tabla 1. Rasgos útiles para la identificación de las especies de *Echinococcus* en los hospedadores definitivos. (Fuente: Xiao *et al.* 2006)

	<i>E. granulosus</i> (sentido amplio)	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. oligarthra</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. shiquicus</i>
Distribución	Cosmopolita	Región holoártica	Región neotropical	Región neotropical	Meseta tibetana
Hospedador definitivo	Perros	Zorros/perros	Felinos salvajes	Perro de monte	Zorro tibetano
Hospedador intermediario	Ungulados	Roedores microtinos	Roedores neotropicales	Roedores neotropicales	Pika de la meseta

	<i>E. granulosus</i> (sentido amplio)	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. oligarthra</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. shiquicus</i>
Adulto					
Longitud del cuerpo (mm)	2,0–11,0	1,2–4,5	2,2–2,9	3,9–5,5	1,3–1,7
Nº de segmentos	2–7	2–6	3	3	2–3
Longitud de los ganchos grandes (µm)	25,0–49,0	24,9–34,0	43,0–60,0	49,0–57,0	20,0–23,0
Longitud de los ganchos pequeños (µm)	17,0–31,0	20,4–31,0	28,0–45,0	30,0–47,0	16,0–17,0
Nº de testículos	25–80	16–35	15–46	50–67	12–20
Posición del poro genital					
a. Segmento maduro	Cerca del centro	Anterior al centro	Anterior al centro	Posterior al centro	Cerca del borde superior
b. Segmento grávido	Posterior al centro	Anterior al centro	Cerca del centro	Posterior al centro	Anterior al centro
Útero grávido					
	Se ramifica lateralmente	En forma de bolsa	En forma de bolsa	Tubular	En forma de bolsa
Metacestodo					
	Quistes uniloculares en las vísceras	Quistes uniloculares en las vísceras	Quistes poliquisticos en los músculos	Quistes poliquisticos en las vísceras	Quistes uniloculares en las vísceras

1. *Echinococcus granulosus* (en sentido amplio)

Este parásito se transmite entre los perros domésticos y varias especies unguladas domésticas. El ciclo más importante de *E. granulosus* (en sentido estricto) es el que afecta al perro y la oveja. También existen hospedadores intermediarios y definitivos salvajes, como por ejemplo, lobos y cérvidos (*E. canadensis*) (véase Deplazes *et al.*, 2017 para más información). El estado adulto varía de 2 a 11 mm de longitud y habitualmente posee entre dos y siete segmentos, con un promedio de entre tres y cuatro. El segmento penúltimo es maduro, y normalmente el poro genital se abre posterior a la mitad tanto de los segmentos maduros como de los grávidos. Normalmente, el segmento último (grávido) supone más de la mitad de la longitud del gusano completo. Presenta ganchos rostellares de varios tamaños sobre el protoescólex formando dos coronas. El tamaño de los ganchos varía entre 25 y 49 µm en la primera corona y entre 17 y 31 µm en la segunda. El útero grávido tiene saculaciones bien desarrolladas.

El estado larvario consiste en una vesícula llena de líquido o quiste hidatídico que es unilocular, aunque también existen cámaras comunicadas. El crecimiento es expansivo, y se pueden crear quistes hijos endógenos. Cada vesícula puede alcanzar un diámetro de hasta 30 cm y tienen lugar con mayor frecuencia en el hígado y los pulmones, pero pueden aparecer en otros órganos internos. La infección por este estadio se denomina equinococosis quística.

2. *Echinococcus multilocularis*

El parásito se transmite principalmente entre los hospedadores definitivos salvajes (p.ej. zorros, *Vulpes vulpes*, *V. corsac*, *Alopex lagopus*) y los pequeños roedores arvicólidos (arvicolinos y leminos). El estado adulto varía entre 1,2 y 4,5 mm de longitud y habitualmente posee de dos a seis segmentos, con un promedio de entre 4 y 5. El penúltimo segmento es maduro de forma característica, y el poro genital se sitúa en la mitad anterior de los segmentos tanto maduros como grávidos. El útero grávido tiene forma de saco. En el rostellado, el tamaño de los ganchos mayores de la primera corona varía entre 24,9 y 34,3 µm, y el de los ganchos menores de la corona interna, entre 20,4 y 31,0 µm.

El metacestodo es una estructura multivesicular que consiste en conglomerados de vesículas pequeñas, que normalmente no exceden de unos pocos milímetros de diámetro. A diferencia de *E. granulosus*, con frecuencia la masa larvaria contiene una matriz semisólida en vez de líquida. Proliferan mediante gemación exógena y esto provoca una infiltración de los tejidos. La infección por esta forma se suele denominar equinococosis alveolar.

Este parásito zoonótico se encuentra principalmente en el hemisferio norte y su ciclo de vida se mantiene sobre todo en la fauna salvaje (Deplazes *et al.*, 2017). Como ocurre con *E. granulosus*, existen variantes genéticas o haplotipos basados en las secuencias génicas del microsatélite EmsB y mitocondriales. Se asocian a distintas regiones geográficas y se han denominado haplotipos Asian, Mongolian, North American 1, North American 2 y European. En Europa, la prevalencia de *E. multilocularis* en zorro rojo osciló entre cero y >10% en distintos países, y más del 50% en zonas muy endémicas. *E. multilocularis* también se ha detectado en zorros árticos (Deplazes *et al.*, 2017). También se ha comprobado que los perros domésticos, los mapaches, los chacales dorados y los lobos pueden actuar como hospedadores definitivos. Ciertos estudios experimentales indican que los gatos domésticos desempeñan un papel poco importante en la transmisión (Kapel *et al.*, 2006). Se sabe que los roedores de los géneros *Microtus*, *Arvicola*, *Myodes* y *Lemmus* son hospedadores intermediarios adecuados, igual que las ratas almizcleras (*Ondatra zibethicus*), las nutrias/coipos (*Myocastor coypus*) y los castores (*Castor fiber*).

3. *Echinococcus oligarthra*

Habitualmente, este parásito utiliza a los felinos salvajes neotropicales como hospedadores definitivos (p.ej. *Felis concolor*, *F. jaguarundi*) y a los roedores grandes (p.ej. *Dasyprocta* sp., *Cuniculus paca*) como hospedadores intermediarios. El adulto tiene una longitud de entre 2,2 y 2,9 mm y normalmente posee tres segmentos, el penúltimo de los cuales es maduro. El poro genital está en la mitad anterior de los segmentos maduros y aproximadamente se sitúa a la mitad en los segmentos grávidos. El útero grávido tiene forma de saco.

El metacestodo es poliquístico, está lleno de líquido y tiene tendencia a estar septado y multicompartimentalizado. La longitud de los ganchos rostelares del protoescólex varía entre 25,9 y 37,9 μm . Los ganchos se describen con más detalle en el apartado siguiente, donde se comparan con los de *E. vogeli*. El quiste único puede alcanzar un diámetro aproximado de 5 cm. Los lugares preferidos son los órganos internos y los músculos. Hasta la fecha, sólo hay constancia de tres casos en el hombre. Parece que el parásito no madura en los perros.

4. *Echinococcus vogeli*

El parásito utiliza el perro de monte sudamericano (*Speothus venaticus*) como hospedador definitivo salvaje habitual, aunque el perro doméstico también es susceptible, mientras que los grandes roedores (p.ej. *Cuniculus paca*) actúan como hospedadores intermediarios. La longitud del adulto varía entre 3,9 y 5,5 mm, y habitualmente presenta tres segmentos, el penúltimo de los cuales es maduro. El poro genital se sitúa en la mitad posterior de los segmentos tanto maduros como grávidos. El útero grávido no presenta saculaciones laterales y se caracteriza por ser relativamente largo y tener una forma tubular, comparado con otros segmentos, que tienen forma de saco.

El metacestodo es similar al de *E. oligarthra*. Se ha descrito que las dos especies se pueden distinguir si se comparan las diferencias en las dimensiones y las proporciones de los ganchos rostelares del protoescólex. La longitud de los ganchos grandes de *E. oligarthra* varía entre 25,9 y 37,9 μm (media de 33,4 μm) y la de los pequeños, entre 22,6 y 29,5 μm (con una media de 25,45 μm). Los ganchos grandes de *E. vogeli* varían entre 19,1 y 43,9 μm (media de 41,64 μm) y los pequeños entre 30,4 y 36,5 μm (media de 33,6 μm). En el caso de *E. oligarthra* los guarda-ganchos dividen el gancho al 50:50, en tanto que en el caso de *E. vogeli*, lo dividen al 30:70.

E. vogeli es un agente zoonótico que ha causado aproximadamente un total de 200 casos humanos descritos en Sudamérica. La infección debida al estadio larvario de esta especie se suele denominar equinococosis poliquística.

5. *Echinococcus shiquicus*

Este parásito se encontró en el zorro tibetano (*Vulpes ferrilata*), su hospedador definitivo, y en el pika de la meseta (*Ochotona curzoniae*), su hospedador intermediario. En la mayoría de las especies de *Echinococcus*, el segmento grávido está conectado con un segmento maduro; sin embargo, un rasgo único de esta especie es que tiene una estrobila formada por dos segmentos (un segmento grávido conectado directamente con un segmento prematuro (Xiao *et al.*, 2005). La forma adulta es morfológicamente semejante a *E. multilocularis* pero difiere por sus ganchos más pequeños, un menor número de segmentos, posición elevada del poro genital en el segmento maduro y un menor número de huevos en el segmento grávido. Se distingue fácilmente del *E. granulosus* por su menor longitud, útero grávido no bifurcado y posición anterior del poro genital en el segmento grávido. El adulto mide entre 1,3 y 1,7 mm.

El metacestodo se encuentra principalmente en pulmones de pikas y es fundamentalmente un miniquiste unilocular que contiene cápsulas de cría plenamente desarrolladas; sin embargo, también se han observado

formas oligovesiculares. Se diferencia de *E. granulosus* por la ausencia de quistes hijo dentro del quiste fértil (OMS/OIE, 2001).

En el Manual de Equinocosis en Humanos y Animales de la OMS y la OIE se puede encontrar una descripción detallada de la equinocosis en el hombre y en otros animales (OMS/OIE, 2001).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 2. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la equinocosis y su propósito

Método	Propósito (quistes de metacestodo en hospedadores intermediarios)					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos ¹	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
Identificación del parásito /inspección de la carne	++	–	++	++	++	–
Detección de antígeno	–	–	–	–	–	–
PCR	–	–	–	+++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	–	–	–	–	+	+
Propósito (gusanos adultos en hospedadores definitivos carnívoros)						
Identificación del agente						
Aislamiento del parásito/ microscopía	+	+	+++	+++	++	–
Detección del antígeno	+	+++	+++	+++	+++	–
PCR	–	++	+++	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	–	–	–	–	+	–

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis

1. Identificación del agente

En el hospedador intermediario, el diagnóstico se basa en la inspección de la carne o en la detección de las formas larvianas quísticas, que pueden encontrarse en casi todos los órganos, pero particularmente en el hígado y los pulmones. El diagnóstico de la equinocosis en los perros y otros carnívoros requiere la demostración de los cestodos adultos de *Echinococcus* spp. en las heces o el intestino delgado, o la detección de los

1 Post-mortem en el caso de los hospedadores intermediarios.

coproantígenos específicos o del copro-ADN. Existen revisiones exhaustivas relativas a los procedimientos de diagnóstico de *E. granulosus* (Craig *et al.*, 2015) y de *E. multilocularis* (Conraths & Deplazes, 2015).

Los investigadores que llevan a cabo estos procedimientos están expuestos a la infección y a una enfermedad grave, por lo que estos deben minimizarse mediante los procedimientos apropiados de bioseguridad y biocontención, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). El material infectante (huevos/adultos) se puede descontaminar congelándolo a -80°C (temperatura interna central) durante 5 días o por calentamiento a 70°C durante 12 horas. Se deben llevar puestas mascarillas faciales, guantes desechables y un delantal. No es fiable la desinfección química, aunque puede utilizarse hipoclorito de sodio (lejía al 10%) para destruir los huevos (Craig, 1997). El material contaminado se debe destruir por incineración o autoclavado.

1.1. Diagnóstico de la equinocosis larvaria en hospedadores intermediarios

1.1.1. Necropsia

Mientras que la vigilancia de *E. granulosus* en los animales domésticos puede tener lugar en los mataderos autorizados, la de *Echinococcus* sp. en los animales salvajes debe realizarse mediante estudios de campo. Cuando se acometa la labor de vigilancia con *E. granulosus* en los hospedadores intermedios, es de vital importancia que se estratifiquen y se registren los datos de acuerdo a la edad de los animales sacrificados. Las tasas de prevalencia están estrechamente relacionadas con el factor edad y los informes de los mataderos en los que solo se puede sacrificar animales jóvenes reflejan de manera insuficiente la situación real. Eso se debe a que los animales más viejos pueden estar fuertemente infectados incluso en el caso de que tengan muy pocas larvas.

Los quistes hidatídicos se pueden observar en muchos órganos, pero en los animales grandes, tales como las ovejas y las vacas, se debería realizar una palpación o una incisión. Los cerdos, el ganado vacuno, las ovejas y las cabras también pueden resultar infectados por larvas de *Taenia hydatigena*, y a veces es difícil diferenciar entre estos dos parásitos cuando se encuentran en el hígado. Para realizar un diagnóstico diferencial en los animales salvajes, tales como los rumiantes y los roedores, se debería considerar la posibilidad de otros cestodos larvarios diversos. Por favor, consulte el Capítulo 3.9.5 *Cisticercosis* para más información sobre otros cestodos que pueden hallarse durante la inspección de la carne.

- i) Debe extraerse del órgano el material sospechoso de estar parasitado cortando con un bisturí para incluir el tejido hospedador inmediato, y conservarse en un lugar fresco. (NB: el tejido de quiste hidatídico de los quistes intactos permanecerá viable durante más de 24 horas tras la muerte incluso a temperatura ambiente. No obstante, la viabilidad se prolongará si se conserva a 4°C hasta un máximo de 72 horas. Si el material no se puede examinar dentro de este periodo de tiempo, deberá conservarse o bien en formol al 10% en solución salina si va a realizarse un examen microscópico posterior o bien en etanol al 70-90% si va a realizarse un análisis del ADN. Lo óptimo es conservar una muestra de material del parásito en ambos medios. Los tejidos de los parásitos que se congelen no serán viables pero pueden examinarse desde el punto de vista morfológico tras una congelación y someterse a análisis del ADN).
- ii) Para el análisis morfológico del contenido de los quistes, debe extraerse y conservarse el líquido mediante una jeringa. A continuación, el material del interior del quiste debe lavarse con solución salina y examinarse al microscopio (objetivo $\times 4$) para comprobar si presenta protoscólices. Téngase en cuenta que ciertos quistes hidatídicos pueden ser estériles y no contener protoscólices. Si no los hay, la capa laminada del interior de la cavidad del quiste tendrá el aspecto de una estructura gelatinosa de la que se puede tirar y desprender fácilmente. El material fijado con formalina se puede teñir mediante técnicas histológicas convencionales. La presencia de una capa laminada acelular, positiva a la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), subyacente a una capa de tejido conectivo y con o sin una membrana germinal nucleada celular interna, se puede considerar como una característica específica de los metacestodos de *Echinococcus* spp.
- iii) En cualquier caso, la única forma de lograr una identificación exacta a nivel de especie/genotipo es la extracción del ADN del material fijado en etanol y el posterior genotipado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ello requiere que haya, o bien protoscólices, o bien trozos de capa germinal. Los quistes extirpados de los animales deben abrirse mediante un corte una vez extraído el líquido, y deben sumergirse trozos de la pared del quiste en etanol al 70%. Es importante recordar que la identificación del genotipo del parásito puede dar información importante acerca de los ciclos de

transmisión, y que un animal determinado podría contener infecciones mixtas por más de un genotipo. Se han identificado cebadores específicos basados en genes mitocondriales (cox 1, ADN) y genes ribosomales (12s) para todas las especies de *Echinococcus* y tenias relacionadas, que se resumen en Roelfsema *et al.* (2016). En la Tabla 4, apartado B.2.2.1, se indican los cebadores para la detección de gusanos adultos

1.2. Diagnóstico de los parásitos adultos en los carnívoros

1.2.1. Necropsia

Invariablemente se emplea la necropsia en el estudio de la equinocosis de los animales salvajes y resulta útil si los carnívoros domésticos se sacrifican de forma indolora. Se debería enfatizar que es necesario aislar e identificar el estado adulto de *Echinococcus*, porque en las condiciones normales del examen fecal, los huevos de *Echinococcus* no se pueden diferenciar de los de *Taenia* spp. Actualmente, los huevos de *E. granulosus* y de *E. multilocularis* se pueden identificar y diferenciar de los de otros ténidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También es importante recordar que todo posible contacto con huevos puede llegar a ser muy peligroso y requiere una gestión del riesgo.

Tras la muerte del animal, se extrae el intestino delgado lo antes posible y se atan sus extremos. Si el material no se congela o se fija con formalina (4–10%), se debería examinar rápidamente, ya que el parásito se puede digerir en unas 24 horas. La formalina no destruye los huevos. El intestino fresco se divide en varios cortes y se sumerge en solución salina al 0,9% a 38±1 °C para realizar el examen. Los parásitos (ténidos o cestodos) adheridos a la pared intestinal se puede observar y hacer su recuento mediante una lupa manual (para *E. granulosus* y *E. vogeli*). Para realizar recuentos exactos, es mejor dividir el intestino no fijado en cuatro o seis cortes, abrirlos y sumergirlos en solución salina al 0,9% a 38±1°C durante 30 minutos para liberar los parásitos. Los contenidos se lavan en otro contenedor para realizar su examen detallado, y la pared intestinal se raspa con una espátula. Todo el material se hierve y lava mediante un tamiz para eliminar la mayoría del material fragmentado y para convertirlo en no infeccioso. Los contenidos y raspados intestinales lavados se colocan en una bandeja negra y se cuentan los parásitos con ayuda de una lupa manual o un microscopio estereoscópico. *Echinococcus granulosus* se encuentra normalmente en el primer tercio del intestino delgado de los perros y *E. multilocularis* en los cortes medio/posteriores. Este sistema ofrece una sensibilidad superior al 95%, excepto en los casos de carga parasitaria baja, que pueden dar lugar a falsos negativos.

La necropsia se considera como el procedimiento más fiable para el diagnóstico de *E. multilocularis* en los hospedadores definitivos. Se trata de un método barato para establecer la prevalencia en una población y del mejor procedimiento para determinar la carga de gusanos. Las canales o los intestinos de los hospedadores definitivos se deben congelar rápidamente y mantener congelados entre –70°C y –80°C durante 3–7 días antes de llevar a cabo la necropsia para matar los huevos. Los huevos de *E. multilocularis* son resistentes a la congelación por debajo –50°C.

1.2.2. Técnica de la sedimentación y el recuento (TSR) (Eckert, 2003)

Esta conocida técnica se ha utilizado mucho, pero es menos sensible que el copro-ADN (PCR).

- i) Se hace una incisión longitudinal en el intestino delgado y se corta en segmentos de 20 cm de largo o en 5 trozos de aproximadamente la misma longitud. Se transfieren dichos trozos a un frasco de vidrio que contenga 1 litro de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%).
- ii) Se agita enérgicamente el frasco de vidrio durante unos segundos y se retiran los trozos de intestino. Se pone al descubierto la capa de mucosa superficial presionándola entre los dedos pulgar e índice para desalojar los helmintos adheridos.
- iii) Se deja que se produzca la sedimentación en el frasco de vidrio durante 15 minutos; a continuación se decanta el sobrenadante. Se rellena el frasco de vidrio con solución salina fisiológica. Se repite ese procedimiento 2–6 veces hasta que el sobrenadante quede libre de partículas coloreadas.
- iv) Se examina la fracción de sedimento en pequeñas porciones de unos 5–10 ml en placas de Petri rectangulares de plástico con una rejilla de recuento (de 9 x 9 cm) bajo luz de transmisión en un estereomicroscopio con un aumento de x120.

- v) Si se encuentran hasta 100 gusanos, se analiza la fracción de sedimento completa; si se observan cifras superiores, se calcula la carga de gusanos a partir del recuento de una submuestra.

1.2.3. Conservación de las muestras

Los cestodos intactos son frágiles y para los estudios morfológicos es mejor manejarlos en solución salina normal con una pipeta Pasteur. Se lavan para eliminar cualquier otro material y se dejan aproximadamente 30 minutos para que cese todo movimiento. En toda caracterización del ADN, los gusanos deben transferirse a etanol al 70-90%. Para estudios morfológicos, deben fijarse en formalina al 5-10%. Al menos una vez al año se aconseja examinar el suero de las personas implicadas en el análisis de estas muestras para detectar posibles anticuerpos anti-*Echinococcus* (OMS/OIE, 2001).

A lo largo de los últimos 15 años, se han desarrollado algunos métodos con el propósito de simplificar y mejorar las investigaciones epidemiológicas en las poblaciones de los hospedadores definitivos y además permitir el diagnóstico de los animales vivos. Entre estos métodos están la detección de los coproantígenos y la detección del ADN mediante la PCR (véase más abajo).

1.3. Vigilancia e investigaciones con arecolina

La purga con arecolina se ha utilizado para llevar a cabo investigaciones de las infecciones por gusanos planos en poblaciones caninas. En la actualidad su empleo como agente de control se ha reemplazado por el praziquantel. La arecolina puede causar incomodidad a los perros y su uso para el diagnóstico se desaconseja.

2. Pruebas coprológicas

Las formas adultas de *Echinococcus* presentes en el intestino liberarán moléculas, ya sean superficiales o secretoras (antígenos), y ADN (normalmente desde el interior de los huevos). Ambos tipos de moléculas pueden ser detectadas analizando muestras fecales. La sensibilidad de las pruebas está claramente influenciada por la carga parasitaria y el grado de madurez del parásito.

2.1. Pruebas de detección de coproantígenos

El ELISA (enzimoinmunoanálisis) de coproantígeno o coproELISA constituye un método alternativo para el diagnóstico de la equinococosis canina, en el que se han empleado anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, ambos dirigidos contra antígenos ya sean somáticos o excretores/secretores (ES). Sin embargo, en general, estas pruebas no se comercializan y se desarrollan en laboratorios de investigación particulares. Como tales, puede existir cierta variabilidad entre pruebas de distintos laboratorios en cuanto a la sensibilidad y a la especificidad. Los CoproELISA suelen ser específicos de género para *Echinococcus* spp. (Allan & Craig, 2006). Para la equinococosis canina debida a *E. granulosus*, la mayoría de autores indica una sensibilidad razonable (78–100%) y una buena especificidad de género, que va desde el 85% a más de un 95%, así como un cierto grado de detección pre-patente (Deplazes *et al.*, 1992). Aunque se observan reacciones cruzadas, en general parece ser que se deben a una infección por *Taenia hydatigena*, la tenia más frecuente en los perros, y los intentos de mejorar la especificidad empleando anticuerpos monoclonales en los coproELISA no han permitido eliminar este problema. La sensibilidad de los coproELISA se correlaciona en gran medida con la carga parasitaria de *E. granulosus*, pero ciertas infecciones de baja intensidad (cargas de gusanos <50–100) pueden dar falsos negativos en los coproELISA (Allan & Craig, 2006).

La necropsia para conseguir detectar la infección de los zorros por *E. multilocularis* requiere bastante tiempo. Las pruebas de coproantígenos mediante el ensayo ELISA ofrecen una alternativa práctica específica. Las muestras fecales de los zorros se deberían tomar *post mortem* a partir del recto en lugar del intestino delgado. Los coproantígenos de *Echinococcus* también son estables en las heces de los zorros o los perros mantenidas a 18–25°C durante 1 semana y en heces de perros congeladas a –20°C. Las pruebas de los coproantígenos también se han utilizado con éxito para evaluar la eficacia de la expulsión de los gusanos de los zorros salvajes infectados con *E. multilocularis* utilizando un cebo que contenía praziquantel, que resultó ser una combinación eficaz para eliminar la fuente de infección.

2.1.1. Procedimiento de la prueba de los coproantígenos clásica (específica del género *Echinococcus* (Craig *et al.*, 1996)

- i) La muestra fecal (recogida en el recto o del suelo) se mezcla con un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, que contenga Tween 20 al 0,3% (PBST), en un tubo desechable con tapón de 5 ml. Se agita vigorosamente y se centrifuga a 2.000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fecales se pueden utilizar inmediatamente o conservar a una temperatura igual o inferior a -20°C , aunque aparezcan muy oscuros o viscosos.
- ii) Se cubre una placa de microtitulación de 96 pocillos para la prueba ELISA con una concentración óptima (típicamente de 5 μg por ml) de la fracción IgG, purificada utilizando la proteína A, de extracto de conejo anti-proglótide de *E. granulosus* en tampón bicarbonato/carbonato 0,05 M, pH 9,6 (100 μl por pocillo). La placa se cubre e incuba toda la noche a 4°C .
- iii) Los pocillos se lavan tres veces con PBST durante 1 minuto en cada lavado; a cada pocillo se añaden 100 μl del mismo tampón y se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
- iv) Se elimina el PBST y se añaden 50 μl de suero fetal bovino limpio a todos los pocillos. A continuación se añaden a cada pocillo 50 μl de los sobrenadantes de las muestras fecales (en pocillos duplicados). La placa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con una lámina plástica que cubra la placa.
- v) Los pocillos se lavan como en el paso (iii), pero los contenidos se vierten en una solución de lejía (hipoclorito) al 10%.
- vi) Se prepara una dilución óptima, con una concentración de entorno a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de la IgG de extracto de conejo anti-proglótide de *E. granulosus* conjugada a peroxidasa (Allan *et al.*, 1992) en PBST y se añaden 100 μl a cada pocillo. La placa se incuba 1 hora a temperatura ambiente ($22-24^{\circ}\text{C}$).
- vii) Los pocillos se lavan como en el paso (iii).
- viii) A continuación, se añaden 100 μl por pocillo del sustrato tetrametil benzidina (TMB) o peroxidasa similar, y la placa se deja en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente ($22-24^{\circ}\text{C}$).
- ix) Se lee la absorbancia de los pocillos a 650 nm. Se para la reacción enzima-sustrato añadiendo 100 μl de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1 M a cada pocillo. El color cambia de azul a amarillo si la reacción es positiva y se lee a 450 nm.
- x) Los laboratorios deberían establecer su propio criterio de punto final utilizando muestras estándares positivas y negativas. También se pueden obtener los estándares a partir de los laboratorios de referencia de la OIE (véase el cuadro de la Parte 4 de este *Manual para los animales terrestres*). Normalmente, el umbral de positivo a negativo se acepta como 3 desviaciones estándares por encima del valor medio de la absorbancia de los controles negativos, o frente a un control positivo estándar de referencia empleando la equivalencia de las unidades de absorbancia.

2.2. Métodos de la prueba copro-ADN

2.2.1. Hospedadores definitivos

Aunque el ELISA de coproantígeno proporciona una alternativa en general mejor y más práctica que la purga con arecolina para la detección pre-mortem de la equinococosis canina, su falta de especificidad de especie supone un inconveniente, sobre todo en estudios epidemiológicos. La amplificación de fragmentos pequeños de ADN de *Equinococcus* específicos de especie en huevos o heces mediante PCR se describió por primera vez en infecciones de zorros por *E. multilocularis*, con escasa inhibición y sensibilidad que posteriormente aumentaron con la concentración de los huevos mediante tamizado y flotación con cloruro de zinc de las muestras fecales (Mathis *et al.*, 1996). Cabrera *et al.* (2002) aplicaron esta técnica dirigida al gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (cox 1) mitocondrial de *E. granulosus* como prueba de principio para la identificación mediante PCR de huevos de *E. granulosus* (con una sensibilidad analítica de cuatro huevos) aislados de gusanos adultos y muestras fecales de perros necropsiados en Argentina. La capacidad de ejecutar una PCR con muestras o extractos fecales directamente sin aislar primero los huevos de las tenias es una ventaja, sobre todo cuando se deben analizar cantidades relativamente grandes de muestras. No obstante, el material fecal conservado en solución salina con formol no es adecuado para la amplificación de ADN, sino que debe utilizarse etanol al 70%. Para extraer ADN total de

muestras fecales caninas (1-2 g), pueden emplearse kits comerciales de extracción diseñados para muestras fecales. Este método se ha empleado con al menos dos coproPCR, basadas en la repetición EgG1 Hae III (Abbasi *et al.*, 2003) y en el gen de la subunidad 1 de la deshidrogenasa NADH (ND1) (Boufana *et al.*, 2013).

En los últimos años, se han producido varios avances destinados a simplificar la amplificación del ADN (como la amplificación isotérmica mediada por bucle [LAMP]) (Ni *et al.*, 2014; Salant *et al.*, 2012) y a mejorar la sensibilidad y la especificidad (como la PCR en tiempo real) (Dinkel *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2014; Øines *et al.*, 2014). Este hecho es importante para el diagnóstico diferencial entre genotipos de *E. granulosus*, *E. multilocularis* y otras tenias existentes en la misma zona geográfica. En concreto, las PCR múltiples son útiles para la detección multiespecie (Dinkel *et al.*, 2011; Trachsel *et al.*, 2007). En la actualidad, hay varias PCR publicadas para el complejo *E. granulosus* y para *E. multilocularis* (Tabla 4), cuya gran utilidad radica en que aportan una especificidad absoluta o extremadamente alta, hasta tal punto que un resultado puede considerarse una alternativa al propio hallazgo de gusanos en la necropsia o purga. No obstante, un diagnóstico basado exclusivamente en técnicas de PCR se considera una estrategia inadecuada para los programas de vigilancia o cribado a gran escala debido a la gran laboriosidad y al alto coste de este procedimiento. La forma más práctica y eficiente de analizar perros a gran escala es adoptar una estrategia de análisis seriados basada en un cribado inicial de todas las muestras mediante coproELISA, seguido de un análisis de todos los positivos mediante coproPCR y garantizando que se tomen muestras por duplicado de todos los animales y que se fijen de la forma adecuada en cada técnica.

Tabla 4. Cebadores para PCR utilizados para la detección mediante coproDNA (modificado de Craig *et al.*, 2015). El tejido indica que la técnica también es compatible con la extracción de ADN de tejidos de metacestodo.

Gen	Especie	Muestra coprológica	Tejido	Referencia
cox1 Cebador directo: 5'-TCA-TAT-TTG-TTT-GAG-KAT-YAG-TKC-3', Cebador inverso: 5'-GTA-AAT-AAM-ACT-ATA-AAA-GAA-AYM-AC-3'	<i>E. granulosus</i>	Huevos	Sí	Cabrera <i>et al.</i> , 2002
EgG1HaeIII Eg1121a 5'-GAA-TGC-AAG-CAG-CAG-ATG-3' (antisentido) Eg1122a 5'-GAG-ATG-AGT-GAG-AAG-GAG-TG-3' (sentido)	<i>E. granulosus</i> s.l	Heces	Sí	Abbasi <i>et al.</i> , 2003
12sRNA Eg1f, 5'-CAT-TAA-TGT-ATT-TTG-TAA-AGT-TG-3'; Eg1r, 5'-CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C-3'	<i>E. granulosus</i> G1	Huevos / Heces	Sí	Stefanic <i>et al.</i> , 2004
12S rRNA G1: E.g.ss1for. 5'-GTA-TTT-TGT-AAA-GTT-GTT-CTA-3' E.g.ss1rev. 5' CTA-AAT-CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-T-3' G5, G6, G7: E.g.cs1for. (5'-ATT-TTT-AAA-ATG-TTC-GTC-CTG-3') E.g.cs1rev. (5'-CTA-AAT-AAT-ATC-ATA-TTA-CAA-C-3', PCRs semianidadas específicas de G6/7 (g6/7 PCR; par de cebadores E.g.camel.for. 5'-ATG-GTC-CAC-CTA-TTA-TTT-CA-3' y E.g.cs1rev.) y para <i>E. ortleppi</i> (g5 PCR; par de cebadores E.g.cattle.for. 5'-ATG-GTC-CAC-CTA-TTA-TTT-TG-3' y E.g.cs1rev.)	<i>E. granulosus</i> G1, G5, G6/7	No	Sí	Dinkel <i>et al.</i> , 2004
Cox1, NAD, rrnS Secuencias múltiples denominadas	<i>E. granulosus</i> , <i>Taenia</i> spp.	Huevos	Sí	Trachsel <i>et al.</i> , 2007
PCR anidada-múltiple en tiempo real Secuencia de cebador/sonda (5'-3') P60.short.for TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC P375.short.rev TGA-CGG-GCG-GTG-TGT-ACC CVF.for TTA-ATG-ACC-AAC-ATT-CGA-AA CVF.rev AGG/T-ACA/G-TAG/C-CCC-ATA/G-AAA/T-GC Pnest.for	<i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> (G1), <i>E. ortleppi</i> , <i>E. canadensis</i> (G6, G7), otras tenias	Heces	Sí	Dinkel <i>et al.</i> , 2011

Gen	Especie	Muestra coprológica	Tejido	Referencia
ACA-ATA-CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC Pnest.rev ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA CVF.light for TCA/T-GCC/T-TGA-TGA/G-AAC-TTC-GGA/G-TCC CVF.light rev AC/TA/G-ATT-CCA-ATA/G-TTT-CAT-GTC/T-TCT emulti-fl CTA-AAA-CTA-CAC-AAA-CTT-ACA-TTA-CTA--FL emulti-705 LC705-ACA-ATA-ATA-TCA-AAC-CAG-ACA-TAC-ACC-A--PH CaVuFe1-fl ATA-CAC-TAT-ACA-TCT-GAC-AC--FL CaVuFe2-640 LC640-GCT-ACT-GCT-TTC-TCA-TCT-G--PH				
Método LAMP Eg1121aGAA-TGC-AAG-CAG-CAG-ATGEg1122aGAG-ATG-AGT-GAG-AAG-GAG-TGFIP1echCTT-TTC-CGG-ATG-GGT-AGG-CAT-CTT-TTG-ATC-ACT-CCT-ATT-CTA-GCA-TGTBIP1echCGT-GCT-GTG-GAG-GTA-GTT-TCG-TTT-TCA-GTG-AGA-TGA-GTG-AGA-AGG	<i>E. granulosus</i> G1	Huevos	Sí	Salant <i>et al.</i> , 2012
ND1 Eg1F81, 5'-GTT-TTT-GGC-TGC-CGC-CAG-AAC-3' and Eg1R83, 5'-AAT-TAA-TGG-AAA-TAA-TAA-CAA-ACT-TAA-TCA-ACA-AT-3' EmF19/3, 5'-TAG-TTG-TTG-ATG-AAG-CTT-GTT-G-3' and EmR6/1, 5'-ATC-AAC-CAT-GAA-AAC-ACA-TAT-ACA-AC-3'	<i>E. granulosus</i> G1; <i>E. multilocularis</i> ; <i>E. shiquicus</i>	Heces	Sí	Boufana <i>et al.</i> , 2013
Muchos cebadores mitocondriales y nucleares	Complejo <i>E. granulosus</i> G1–G10	(Huevos)	Sí	Boubaker <i>et al.</i> , 2013
Cebadores del gen Nad5 inc. (método LAMP) Nombre del cebador Secuencia (5' → 3') FIP TTA-ACC-AAC-CAA-TAA-CAA-CCC-AGT-gaattc-GTG-GTG-TTA-GTT-ATT-TGG-TTA-GG BIP ATG-TGA-CGT-TTG-GTG-TGG-TAG-TTA-gaattc-AAG-AAC-CAC-CAA-AAT-AAT-GTC-T F3 GTG-TGT-TGC-TAT-ATT-GCT-TGT B3 AAC-TTT-AAC-AAC-ATA-CAC-CTA-GT	<i>E. granulosus</i> s.s (G1)	Heces	Sí	Ni <i>et al.</i> , 2014
Captura magnética – PCR mt 12S rRNA gene EMrtCO1F' (5'-TGG-TAT-AAA-GGT-GTT-TAC-TTG-G-3'), EMrtCO1Rew' (5'-ACG-TAA-ACA-ACA-CTA-TAA-AAG-A-3'), y Sonda Zen: 5'-56-FAM/-TCT-AGT-GTA/Zen/-AAT-AAG-AGT-GAT-CCT-ATT-TTG-TGG-TGG-GT/3IABkFq/-3'	<i>E. multilocularis</i>	Heces	Sí	Isaksson <i>et al.</i> , 2014
Gen de la subunidad ribosomal grande por PCR en tiempo real (rrnL) Em-rrn cebador directo: 5'-CTG-TGA-TCT-TGG-TGT-AGT-AGT-TGA-GAT-TT-3' Em-rrn cebador inverso: 5'-GGC-TTA-CGC-CGG-TCT-TAA-CTC-3' Em-sonda con indicador 6-carboxifluoresceína (FAM) y silenciador tetrametilrodamina (TAMRA): 5'-TGG-TCT-GTT-CGA-CCT-TTT-TAG-CCT-CCA-T-3'	<i>E. multilocularis</i>	Heces	Sí	Knapp <i>et al.</i> , 2014

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle

3. Pruebas serológicas

3.1. Hospedadores intermediarios

El diagnóstico serológico de la equinocosis ovina se ha considerado durante mucho tiempo un sistema posiblemente importante para los estudios epidemiológicos en zonas endémicas, así como para los programas de vigilancia y control hidatídico. Hace muchos años que se sabe que las ovejas infectadas experimentalmente por *E. granulosus* pueden desarrollar respuestas de IgG específicas

detectables en cuestión de semanas. No obstante, los niveles de anticuerpos séricos variaron en gran medida en las infecciones naturales, lo cual dio lugar a una reducción de la sensibilidad y a reacciones cruzadas en animales infectados por *Taenia hydatigena* o *T. ovis*. Actualmente, este sistema no es sustitutivo de la necropsia (McManus, 2014; Craig *et al.*, 2015).

3.2. Hospedadores definitivos

Se considera que las pruebas serodiagnósticas para la equinococosis canina tienen muchas posibilidades de resultar útiles en la práctica para los casos de infección canina por *E. granulosus*, y que inicialmente pueden constituir un sustituto de la purga con arecolina. En las infecciones naturales, la especificidad diagnóstica fue buena (>90%) pero la sensibilidad en general fue mala (35–40%), y fue muy inferior a la de la detección de coproantígeno (Jenkins *et al.*, 1990). Estudios futuros destinados a evaluar los antígenos recombinantes existentes o a desarrollar otros nuevos podrían mejorar la sensibilidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la equinococosis canina.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Hospedadores intermediarios

Es probable que la aplicación de una vacuna eficaz para disminuir la infección hidatídica en el ganado tenga un impacto importante en la tasa de transmisión de la enfermedad al hombre (Lightowlers, 2006). Puesto que *E. granulosus* pertenece a la familia de los ténidos, muchos aspectos de su relación inmunológica con su hospedador intermedio son similares a los que ocurren con las especies de *Taenia*. Es más, se consideró que el enfoque seguido en la elaboración de las vacunas contra las especies de *Taenia*, como los antígenos nativos de *T. ovis*, que protegen al hospedador, también sería eficaz contra *E. granulosus*. Por lo tanto, en 1996 se desarrolló una vacuna de antígeno recombinante, EG95, empleando una proteína de oncosfera de *E. granulosus* expresada en *Escherichia coli*. Se ha comprobado que esta vacuna genera niveles altos de protección (96–100%) contra la infección de desafío experimental por *E. granulosus* en ovejas. Desde entonces, la vacuna se ha aplicado con éxito en estudios experimentales de distintos países realizados con ovejas y otros hospedadores intermediarios. La vacuna EG95 dispone de licencia en algunos países (Lightowlers, 2006).

2. Hospedadores definitivos

Teóricamente, el desarrollo de vacunas caninas contra *E. granulosus* reduciría la fecundidad y las poblaciones del parásito y constituiría un paso fundamental hacia la reducción (prevención) de la presión de infección en los hospedadores intermediarios, reduciendo así (previniendo) la infección en los perros. No obstante, todavía no se ha identificado claramente ninguna molécula candidata.

BIBLIOGRAFÍA

ABBASI I., BRANZBURG A., CAMPOS-PONCE M., ABDEL HAFEZ S.K., RAOUL F., CRAIG P.S. & HAMBURGER J. (2003). Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**, 324–330.

ALLAN J.C. & CRAIG P.S. (2006). Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. *Parasitol. Int.*, **55**, S75–S80.

BOUBAKER G., MACCHIAROLI N., PRADA L., CUCHE M.A., ROSENZVIT M.C., ZIADINOV I., DEPLAZES P., SAARMA U., BABBA H., GOTTSTEIN B. & SPILLOTIS M. (2013). A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **7**, 1–13.

BOUFANA B., UMHANG G., QIU J., CHEN X., LAHMAR S., BOUÉ F., JENKINS D.J. & CRAIG P.S. (2013). Development of three PCR assays for the differentiation between *Echinococcus shiquicus*, *E. granulosus* (G1 genotype), and *E. multilocularis* DNA in the co-endemic region of Qinghai-Tibet plateau, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**, 795–802.

CABRERA M., CANOVA S., ROSENZVIT M. & GUARNERA E. (2002). Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Parasitology*, **44**, 29–34.

CONRATHS F.J. & DEPLAZES P. (2015). *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Vet. Parasitol.*, **213**, 149–161.

- CRAIG P.S., ROGAN M.T. & ALLAN J.C. (1996). Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv. Parasitol.* **38**, 169–250.
- CRAIG P.S., MASTIN A., VAN KESTERIN F. & BOUFANA B. (2015). *Echinococcus granulosus*: Epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. *Vet. Parasitol.*, **213**, 132–148.
- DEPLAZES P., GOTSTEIN B., ECKERT J., JENKINS D.J., WALD D. & JIMENEZ-PALACIOS S. (1992). Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol. Res.*, **78**, 303–308.
- DEPLAZES P., RINALDI L., ALVAREZ ROJAS C.A., TORGERSON P.R., HARANDI M.F., ROMIG T., ANTOLOVA D., SCHURER J.M., LAHMAR S., CRINGOLI G., MAGAMBO J., THOMPSON R.C. & JENKINS E.J. (2017). Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Adv. Parasitol.*, **95**, 315–493.
- DINKEL A., KERN S., BRINKER A., OEHME R., VANISCOTTE A., GIRAUDOUX P., MACKENSTEDT U. & ROMIG T. (2011). A real-time multiplex-nested PCR system for coprological diagnosis of *Echinococcus multilocularis* and host species. *Parasitol. Res.*, **109**, 493–498.
- DINKEL A., NJOROG E.M., ZIMMERMANN A., WÄLZ M., ZEYHLE E., ELMAHDI I.E., MACKENSTEDT U. & ROMIG T. (2004). A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 645–653.
- ECKERT J. (2003). Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.*, **85**, 157–163.
- ISAKSSON M., HAGSTÖM A., ARMUA-FERNANDEZ M.T., WAHLSTRÖM H., ÅGREN E., MILLER A., HOLMBERG A., LUKACS M., CASULLI A., DEPLAZES, P. & JUREMALM M. (2014). Asemi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-timePCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples. *Parasit. Vectors*, **19**, 583.
- JENKINS D.J., GASSER R.B., ZEYHLE E., ROMIG T. & MACPHERSON C.N.L. (1990). Assessment of a serological test for the detection of *Echinococcus granulosus* infection in dogs in Kenya. *Acta Trop.*, **47**, 245–248.
- KAPEL C.M.O., TORGERSON P.A., THOMPSON R.C.A. & DEPLAZES P. (2006). Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Intl J. Parasitol.*, **36**, 79–86.
- KNAPP J., MILLON L., MOUZON L., UMHANG G., RAOUL F., ALI Z.S., COMBES B., COMTE S., GBAGUIDI-HAORE H., GRENOUILLET F. & GIRAUDOUX P. (2014). Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Vet. Parasitol.*, **201**, 40–47.
- LIGHTOWLERS M.W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology*, **133**, S27–42.
- MATHIS A., DEPLAZES P. & ECKERT J. (1996). An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helminthol.*, **70**, 219–222.
- McMANUS D.P. (2014). Immunodiagnosis of sheep infections with *Echinococcus granulosus*: in 35 years where have we come? *Parasite Immunology*, **36**, 125–130.
- NAKAO M., LAVIKAINEN A., YANAGIDA T. & AKIRA I. (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.*, **43**, 1017–1029.
- NI X.W., McMANUS D.P., LOU Z.L., YANG J.F., YAN H.B., LI L., LI H.M., LIU Q.Y., LI C.H., SHI W.G., FAN Y.L., LIU X., CAI J.Z., LEI M.T., FU B.Q., YANG Y.R. & JIA W.Z. (2014). A comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with other surveillance tools for *Echinococcus granulosus* diagnosis in caninedefinitive hosts. *PLoS One* **9**, e100877.
- ØINES Ø., ISAKSSON M., HAGSTRÖM Å., TAVORNPANICH S. & DAVIDSON R.K. (2014). Laboratory assessment of sensitive molecular tools for detection of low levels of *Echinococcus multilocularis* eggs in fox (*Vulpes vulpes*) faeces. *Parasit. Vectors*, **7**, 246.
- ROELFSEMA J.H., NOZARI N. PINELLI E. & KORTBEEK L.M. (2016). Novel PCRs for differential diagnosis of cestodes. *Exp. Parasitol.*, **161**, 20–26.

ROMIG T., EBI D. & WASSERMANN M. (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* sensu lato. *Vet. Parasitol.* **213**, 76–84.

SALANT H., ABBASI I. & HAMBURGER J. (2012). The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* coprodetection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 883–887.

STEFANIC S., SHAIKENOV B.S., DEPLAZES P., DINKEL A., TORGERSON P.R. & MATHIS A. (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ('sheep strain') in naturally infected dogs. *Parasitol. Res.*, **92**, 347–351.

TRACHSEL D., DEPLAZES P. & MATHIS A. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, **134**, 911–920.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, Eckert J., Gemmell, M.A., Meslin F.-X., Pawlowski Z.S., eds. OIE (World Organisation for Animal Health), Paris, France, 1–265.

XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 693–701

XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2006). *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol. Int.*, **55**, S233–236.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Equinococosis (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>) Por favor, contacte con el Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Equinococosis.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO EQUINOCOCOSIS/HIDATIDOSIS;
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.