

## CAPÍTULO 3.1.6.

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

---

### RESUMEN

La equinococosis quística humana, causada por *Echinococcus granulosus sensu lato*, 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 sobre todo para programas de cribado epidemiológico. En el caso del estadio de metacestodo, en humanos, el diagnóstico se lleva a cabo por técnicas de imagen con la ayuda de pruebas inmunológicas, mientras que en los animales, el diagnóstico se basa en la detección post-mortem de la forma larvaria 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) y la secuenciación del ADN.

**Detección 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*, mientras que los genotipos G1,3, 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. Se pueden detectar formas larvarias de *E. granulosus sensu lato* y de *E. multilocularis* en hospedadores intermediarios mediante examen macroscópico y microscópico de varios 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 mediante PCR/secuenciación es el único método disponible para confirmar la especie exacta de *Echinococcus* que está infectando a los animales.

En la necropsia se utiliza el intestino delgado para detectar la forma adulta de *Echinococcus* spp. en hospedadores definitivos (carnívoros salvajes y 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 solo en algunos países en 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 antígenos de gusano adulto, pueden surgir falsos positivos. 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. Además, en ocasiones, la sensibilidad y la especificidad analítica puede ser baja porque también puede haber una reacción cruzada entre especies de *Echinococcus* y de *Taenia*.

**Requisitos para las vacunas:** Una vacuna contra *E. granulosus* en sentido estricto basada en el antígeno recombinante EG95 ha demostrado ser segura y eficaz en el ganado. Existen vacunas comerciales contra EG95 que se fabrican en Argentina, Marruecos y China (Rep. Pop.). Estas vacunas están registradas y han obtenido la aprobación reglamentaria en los países de fabricación, así como en otros países. La vacuna EG95 fue adoptada en 2016 como parte obligatoria del programa nacional de control de la equinococosis en China. No existe ninguna vacuna para la infección por *Echinococcus* en los hospedadores definitivos del parásito.

## A. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Echinococcus* consisten en pequeñas (1–11 mm de longitud) tenias de carnívoros cuya fase larvaria (metacestodos) prolifera de forma asexual enquistándose en los órganos internos 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. oligartha*, *E. vogeli* y *E. shiquicus*. Sin embargo, actualmente, en base a los datos obtenidos de la biología, la epidemiología y, en particular, el genotipado molecular, se recomienda la inclusión de, al menos, nueve especies en este género. *Echinococcus granulosus* sensu lato, anteriormente considerada una especie única con una gran diversidad genotípica y fenotípica, ahora está reconocida como conjunto de cinco 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* (sensu lato) 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). Los estudios realizados que se basan en la práctica totalidad del genoma mitocondrial y en secuencias de ADN nuclear considerablemente largas sugieren que el genotipo G2 previo se considere una microvariante de G3 (Kinkar et al., 2017) y que *E. canadensis* se considere un clúster formado por dos especies distintas (Laurimae et al., 2018).

*E. granulosus* (sensu lato) tiene una distribución mundial; *E. multilocularis* se encuentra en zonas amplias del hemisferio norte, *E. shiquicus* se encuentra en la meseta tibetana y *E. oligartha* y *E. vogeli* están confinadas a Centroamérica y Sudamérica. Casi todas las especies descritas inicialmente son infectivas en el hombre y causan varias enfermedades equinocócicas, aunque en la clasificación taxonómica más reciente no hay pruebas de infecciones por *E. shiquicus* o *E. felidis* en el ser humano (Ma et al., 2015). La equinococosis quística (EQ) humana, causada por *E. granulosus* (sentido amplio), y la equinococosis alveolar (EA), 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 derivada directa o indirectamente de hospedadores definitivos. El fuerte potencial zoonótico de *E. granulosus* s.l. tiene que ver principalmente con *E. granulosus* (sensu stricto – sentido estricto – s.s). (Alvarez Rojas et al., 2014). 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*. (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	Carnívoros salvajes y domésticos	Zorros/perros	Felinos salvajes	Perro de monte	Zorro tibetano
Hospedador intermediario	Ungulados	Roedores microtinos	Roedores neotropicales	Roedores neotropicales	Pika de la meseta
<b>Adulto</b>					
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
<b>Posición del poro genital</b>					
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 uniuquísticos en los músculos	Quistes poliúquísticos en las vísceras	Quistes uniloculares en las vísceras

### 1. *Echinococcus granulosus* (sensu lato – s.l.)

Este parásito se transmite entre los perros domésticos y varias especies unguladas domésticas. En los países en que la cría de ovejas desempeña un papel importante en la economía local, *E. granulosus* s.s. se mantiene de forma prevalente mediante un ciclo perro-oveja. Se han descrito ciclos selváticos en los que intervienen distintos hospedadores definitivos e intermediarios (como el lobo o los ciervos) respecto a *E. canadensis* (véase Deplazes et al., 2017 para más ilustración) y a *E. felidis*, en los que el león o la hiena manchada actúan como hospedadores definitivos. Algunas cepas tienen cierta predilección por algunos hospedadores intermediarios, como *E. equinus* por los caballos, *E. ortleppi* por el ganado bovino o *E. canadensis* por los cerdos, camellos o cérvidos. El gusano 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 metacestodo, denominado hidátida, consiste en una vesícula llena de líquido que suele ser unilocular, aunque también pueden existir cámaras comunicadas. El crecimiento es expansivo, y pueden producirse nuevas hidátides (quistes hijos) dentro y, ocasionalmente, fuera del quiste. Cada quiste de CE puede alcanzar hasta 30 cm de

diámetro y se producen principalmente en el hígado y los pulmones. Otros órganos internos se ven afectados con menor frecuencia. 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 rostelo, el tamaño de los ganchos mayores de la primera corona varía entre 24,9 y 34,3  $\mu\text{m}$ , y el de los ganchos menores de la corona interna, entre 20,4 y 31,0  $\mu\text{m}$ .

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  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$  (media de 33,4  $\mu\text{m}$ ) y la de los pequeños, entre 22,6 y 29,5  $\mu\text{m}$  (con una media de 25,45  $\mu\text{m}$ ). Los ganchos grandes de *E. vogeli* varían entre 19,1 y 43,9  $\mu\text{m}$  (media de 41,64  $\mu\text{m}$ ) y los pequeños entre 30,4 y 36,5  $\mu\text{m}$  (media de 33,6  $\mu\text{m}$ ). En el caso de *E. oligarthra* los guardaganchos 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 puede denominar equinococosis neotrópica.

## 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 Equinococosis en Humanos y Animales de la OMS y la OIE se puede encontrar una descripción detallada de la equinococosis en el hombre y en otros animales (OMS/OIE, 2001).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 2. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la equinococosis 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 <sup>(a)</sup>	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección e identificación del agente</b>						
Identificación del parásito/ inspección de la carne	++	-	++	++	++	-
Detección de antígeno	-	-	-	-	-	-
PCR	++	-	-	+++	++	-
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA	-	-	-	-	+	+
<b>Propósito (gusanos adultos en hospedadores definitivos carnívoros)</b>						
<b>Detección del agente</b>						
Aislamiento del parásito/ microscopía	+	+	+++	+++	++	-
Detección del antígeno	+	++	+++	+++	++	-
PCR	-	++	+++	+++	+++	-

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 <sup>(a)</sup>	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA	–	–	–	–	+	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

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

<sup>(a)</sup>Es posible que en la inspección de la carne solo se vean quistes y no se proceda a pruebas posteriores para confirmar que se deben a infección por *Equinococcus granulosus*.

## 1. Detección del agente

En el hospedador intermediario, el diagnóstico se basa en la inspección de la carne o en la detección de las formas larvarias 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 el intestino delgado, o la detección de los coproantígenos específicos o del copro-ADN en las heces. Existen revisiones exhaustivas relativas a los procedimientos de diagnóstico de *E. granulosus* s.l. (Craig et al., 2015) y de *E. multilocularis* (Conraths y 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 1 hora. 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* spp. en los animales salvajes debe realizarse mediante estudios de campo. Cuando se acometa la labor de vigilancia con *E. granulosus* s.l. 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.

Se pueden observar quistes de EQ 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 material parasitario 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 ×4) para comprobar si presenta protoscólices. Téngase en cuenta que ciertos quistes de la EQ pueden ser estériles y no contener protoscólices. Si no los hay, la capa germinal 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 o congelado y el posterior genotipado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, cuando sea necesario, la secuenciación. 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 equinococosis 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. Los tejidos deben congelarse a muy bajas temperaturas, entre los -70°C y los -80°C durante 3-7 días, antes de la necropsia, con el fin de matar todos los posibles huevos.

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 el procedimiento más fiable para el diagnóstico de *E. multilocularis* en los hospedadores definitivos. Se trata de un método útil 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  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $-50^{\circ}\text{C}$ . *Equinococcus multilocularis* puede sobrevivir en nitrógeno líquido (a unos  $-200^{\circ}\text{C}$ ) durante 35 años y seguir siendo infectivo.

### 1.2.2. Técnica de la sedimentación y 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  $9 \times 9$  cm) bajo luz de transmisión en un estereomicroscopio con un aumento de  $\times 120$ .
- 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). Hasta la fecha, sólo se ha informado de unos pocos coproELISA comerciales. Wang *et al.* (2021) evaluaron estas pruebas y descubrieron que tienen una buena sensibilidad y especificidad. Sin embargo, los kits no son fáciles de conseguir. Además, se han descrito varias pruebas desarrolladas en laboratorios de investigación específicos, aunque se ha informado de una cierta variabilidad entre las pruebas de diferentes laboratorios en cuanto a la sensibilidad y la especificidad.

Los CoproELISA suelen ser específicos de género para *Echinococcus* spp. (Allan y 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 pueden ofrecer 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* s.l. 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 µg/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°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°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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 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 OIE1. 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% o congelación. 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 por ejemplo, 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 3), cuya gran utilidad

---

1 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>

radica en que aportan una especificidad extremadamente alta, hasta tal punto que un resultado puede considerarse una alternativa al propio hallazgo de gusanos en la necropsia o purga. Una forma práctica y eficiente de analizar perros o zorros 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 F: 5'-TCA-TAT-TTG-TTT-GAG-KAT-YAG-TKC-3', R: 5'-GTA-AAT-AAM-ACT-ATA-AAA-GAA-AYM-AC-3'	<i>E. granulosus</i> s.l.	Huevos	Sí	Cabrera et al., 2002
EgG1HaeIII Eg1121a F 5'-GAA-TGC-AAG-CAG-CAG-ATG-3' Eg1122a R 5'-GAG-ATG-AGT-GAG-AAG-GAG-TG-3'	<i>E. granulosus</i> s.l.	Heces	Sí	Abbasi et al., 2003
12sRNA Eg1f, F 5'-CAT-TAA-TGT-ATT-TTG-TAA-AGT-TG-3'; Eg1r, R 5'-CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C-3'	<i>E. granulosus</i> G1	Huevos / Heces	Sí	Stefanic et al., 2004
12S rRNA G1: E.g.ss1. F 5'-GTA-TTT-TGT-AAA-GTT-GTT-CTA-3' E.g.ss1 R 5' CTA-AAT-CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-T-3' G5, G6, G7: E.g.cs1 F (5'-ATT-TTT-AAA-ATG-TTC-GTC-CTG-3') E.g.cs1 R (5'-CTA-AAT-AAT-ATC-ATA-TTA-CAA-C-3', PCR semianidadas específicas de G6/7 (g6/7 PCR; E.g.camel. F 5'-ATG-GTC-CAC-CTA-TTA-TTT-CA-3' E.g.cs1 R.) para <i>E. ortleppi</i> (g5 PCR; E.g.cattle. F 5'-ATG-GTC-CAC-CTA-TTA-TTT-TG-3' E.g.cs1 R.)	<i>E. granulosus</i> G1, G5, G6/7	No	Sí	Dinkel et al., 2004
Cox1, NAD, rrnS Secuencias múltiples denominadas	<i>E. multilocularis</i> <i>E. granulosus</i> , <i>Taenia</i> spp.	Huevos	Sí	Trachsel et al., 2007
PCR anidada-múltiple en tiempo real Secuencia de cebador/sonda (5'-3') P60.short. F TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC P375.short. R TGA-CGG-GCG-GTG-TGT-ACC CVF. F TTA-ATG-ACC-AAC-ATT-CGA-AA CVF. R AGG/T-ACA/G-TAG/C-CCC-ATA/G-AAA/T-GC Pnest.for ACA-ATA-CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC Pnest. R ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA CVF.light F TCA/T-GCC/T-TGA-TGA/G-AAC-TTC-GGA/G-TCC CVF.light R 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	<i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> (G1), <i>E. ortleppi</i> , <i>E. canadensis</i> (G6, G7), otras <i>tenias</i>	Heces	Sí	Dinkel et al., 2011

Gen	Especie	Muestra coprológica	Tejido	Referencia
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 et al., 2012
ND1 Eg181, F 5'-GTT-TTT-GGC-TGC-CGC-CAG-AAC-3' Eg1 83, R 5'-AAT-TAA-TGG-AAA-TAA-TAA-CAA-ACT-TAA-TCA-ACA-AT-3' Em19/3, F 5'-TAG-TTG-TTG-ATG-AAG-CTT-GTT-G-3' Em6/1, R 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 et al., 2013
Muchos cebadores mitocondriales y nucleares	Complejo <i>E. granulosus</i> G1-G10	(Huevos)	Sí	Boubaker et al., 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 et al., 2014
Captura magnética – PCR mt 12S rRNA gene <b>EMrtCO1 F'</b> (5'-TGG-TAT-AAA-GGT-GTT-TAC-TTG-G-3'), <b>EMrtCO1 R'</b> (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 et al., 2014
Gen de la subunidad ribosomal grande por PCR en tiempo real (rrnL) Em-rrn cebador: F 5'-CTG-TGA-TCT-TGG-TGT-AGT-AGT-TGA-GAT-TT-3' Em-rrn cebador: R 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 et al., 2014
PCR en tiempo real utilizando una sonda de hidrólisis dirigida a parte del gen mitocondrial "de subunidad ribosómica grande" rrnL-Em F 5'-CTG-TGA-TCT-TGG-TGT-AGT-AGT-TGA-GAT-TT-3' rrnL-Em R 5'-GGC-TTA-CGC-CGG-TCT-TAA-CTC-3'	<i>E. multilocularis</i>	Heces	Sí	Knapp et al., 2014; Knapp et al., 2016
Método multifásico descrito en Santolamazza et al., 2020 Fase: extracción de ADN; Fases 2: PCR Cox1; Fases 3: digestión específica por RFLP AluI para la distinción de G1, G3, G4, G5, G6/7 y G8/G10; Fases 4: PCR múltiple que muestra los patrones de bandas específicos de los genotipos G4-G10	<i>E. granulosus</i> s.l. G1, G3, G4, G5, G6/7 y G8/G10	No disponible	Sí	Cox1: Bowles et al., 1992 modificado por Bart et al., 2006 RFLP AluI: Kim et al., 2017 Multiple PCR: Boubaker et al., 2017

Gen	Especie	Muestra coprológica	Tejido	Referencia
PCR en tiempo real para las secuencias múltiples relativas a Cox1, Cox3, NAD5	<i>E. granulosus</i> s.s. (G1, G3), <i>E. equinus</i> (G4), <i>E. ortleppi</i> (G5), <i>E. canadensis</i> (G6–8, G10)	Heces	Sí	Maksimov et al., 2020

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle

### 3. Pruebas serológicas

#### 3.1. Hospedadores intermediarios

El diagnóstico serológico de la equinococosis 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. 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.

Cada vez hay más pruebas de casos en los que los perros han desarrollado una equinococosis alveolar (EA) causada por la fase larvaria. La EA en los perros se desarrolla rápidamente y pone en peligro la vida. Frey et al. (2017) evaluaron el rendimiento diagnóstico de varios antígenos para la detección serológica de la EA en perros. Se demostró un excelente rendimiento de ELISA con el antígeno EM95 recombinante en combinación con inmunoelectrotransferencia. La prueba puede llegar a detectar la EA en las primeras etapas de desarrollo. Dado que la EA en los perros puede ser concomitante con la fase adulta intestinal, se sugirió que los perros de las zonas endémicas fueran sometidos a pruebas de detección de *E. multilocularis* utilizando los métodos disponibles, incluido el ELISA para EM95, antes de su traslado a regiones no endémicas.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

#### 1.2. Hospedadores intermediarios

La aplicación de una vacuna eficaz para reducir la infección por *E. granulosus* s.s. en el ganado puede tener un impacto sustancial en la tasa de transmisión de la enfermedad a los humanos (Lightowlers, 2006; Torgerson, 2003). Se ha desarrollado una vacuna contra EG95 muy eficaz que puede prevenir la infección por *E. granulosus* s.s. en los hospedadores intermediarios del parásito en el ganado. (Lightowlers et al., 1996; Gauci et al., 2011). Los ensayos de campo de la vacuna han demostrado que la

vacuna reduce el nivel de equinococosis quística en ovejas en condiciones naturales (Amarir *et al.*, 2021; Larrieu *et al.*, 2019). El objetivo final de la vacunación contra *E. granulosus* es reducir la transmisión del parásito y reducir la exposición humana a la equinococosis quística.

Dos vacunaciones subcutáneas, con un mes de diferencia aproximadamente, inducen la protección contra la exposición posterior a los huevos de *E. granulosus*. Se cree que la vacuna no cura una infección existente antes de que el animal sea vacunado. Por esta razón, los animales jóvenes deben recibir su primera vacunación alrededor del momento del destete. La duración de la inmunidad inducida en los animales jóvenes tras una segunda vacunación es suficiente para protegerlos hasta el año de edad, momento en el que una única vacunación de refuerzo provoca una fuerte respuesta protectora suficiente para inducir una protección duradera (Larrieu *et al.*, 2019; Poggio *et al.*, 2016). Por lo tanto, un programa de vacunación que incluya dos vacunaciones en animales recién destetados, seguido de una única vacunación de refuerzo cuando los animales tienen aproximadamente 1 año de edad, constituye un programa eficaz y práctico.

La vacuna contra EG95 se fabrica en Argentina, China (Rep. Pop. de) y Marruecos, y ha obtenido la aprobación reglamentaria en Marruecos y en varios países de Asia oriental y meridional, y de América del Sur).

## 1.2. Hospedadores definitivos

El desarrollo de vacunas contra *E. granulosus* para perros, teóricamente reduciría la fecundidad y las poblaciones de gusanos, y podría ser un paso valioso hacia la reducción (prevención) de la presión de la infección en los hospedadores intermedios, reduciendo así (previniendo) la infección en los perros. Sin embargo, no existen pruebas claras de una protección de base inmunológica contra la infección por *Echinococcus* en los hospedadores definitivos. Los intentos de inmunizar activamente a los perros contra la infección por *E. granulosus* no siempre ha dado resultado.

## 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos de las vacunas para hospedadores intermediarios

La vacuna incorpora 50 µg del antígeno EG95, expresado en *Escherichia coli*, junto con el adyuvante (Quil A o Montanide ISA 70 más saponina) (Gauci *et al.*, 2011; Lightowlers *et al.*, 1996).

### 2.1. Características del inóculo

#### 2.1.1. Criterios de calidad

Las cepas de *E. coli* adecuadas (BB4 LE392.23 [F' *lacI<sup>q</sup>* ZΔM15 *proAB* Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] o BL21 (DE3) F<sup>-</sup>*ompT hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) para la expresión del antígeno vacunal recombinante deberán adquirirse de una fuente que se haya establecido como estéril y pura (libre de los agentes extraños descritos en el Capítulo 1.1.9 y los enumerados por las autoridades competentes en materia de licencias). El vector de expresión pGEX debe obtenerse de una fuente que se sepa que está libre de agentes extraños. Debe verificarse que el inserto de ADN de EG95 en el vector de expresión tiene la secuencia descrita (Gauci *et al.*, 2011; Lightowlers *et al.*, 1996).

### 2.2. Métodos de producción

#### 2.2.1. Procedimiento

Las cepas de *E. coli* adecuadas se transforman con el vector pGEX que contiene el ADNc de EG95 dentro del marco. Las bacterias se cultivan en un medio adecuado, como el caldo Super Optimal. La expresión de la proteína recombinante se induce añadiendo isopropil-β-D-tiogalactosidasa (IPTG) a una concentración de 0,2 mM con incubación durante 3-5 horas, tras lo cual se desecha el sobrenadante del cultivo y se resuspenden los precipitados bacterianos en PBS, a pH 7,4. Tras el enfriamiento en hielo, *E. coli* se lisa por sonicación, prensa francesa u otro equipo adecuado. El grado de lisis de las células bacterianas se controla midiendo el aumento de las proteínas solubles liberadas por las células rotas mediante la determinación de la concentración de proteínas. Las proteínas celulares solubles e insolubles se separan por centrifugación. Tras un breve lavado con PBS, las proteínas insolubles se solubilizan en urea 8 M. La vacuna puede

prepararse a partir de la fracción soluble mediante la purificación por afinidad de la agarosa con glutatión, como describen Lightowlers *et al.* (1996), o a partir de los cuerpos de inclusión insolubles, como describen Gauci *et al.* (2011). Las proteínas se analizan mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) y se cuantifican mediante densitometría de barrido y determinando la concentración de proteínas según Bradford (1976).

### 2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todos los ingredientes que se utilizan para producir la vacuna deben cumplir los requisitos indicados en el Capítulo 1.1.8.

### 2.2.3. Pruebas por lotes de producto final

i) Esterilidad

Deben cumplirse los requisitos indicados en el Capítulo 1.1.8.

ii) Inocuidad

Las pruebas de inocuidad de los lotes se deberán realizar a menos que se demuestre y apruebe una inocuidad uniforme del producto en el expediente de aprobación reglamentaria del registro y se apruebe la uniformidad del proceso de producción con los requisitos estándar mencionados en el Capítulo 1.1.8.

Esta prueba de inocuidad por lotes de producto final se realiza para detectar posibles reacciones adversas anómalas a nivel local o sistémico. Deben examinarse las reacciones locales y generales. Las pruebas deben realizarse administrando la vacuna a las ovejas usando la dosis y vía de administración recomendadas. Deben utilizarse criterios objetivos y cuantificables para detectar y medir las reacciones adversas; éstos incluirían los cambios de temperatura de los grupos vacunados y de control.

iii) Potencia del lote

Las ovejas se vacunan según el protocolo recomendado (dos inyecciones subcutáneas, con un intervalo de 3-4 semanas). Las respuestas de anticuerpos IgG al antígeno EG95 se determinan 2 semanas después de la segunda vacuna, tal como lo describen Heath y Koolaard (2012).

## 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.

AMARIR F., RHALEM A., SADAK A., RAES M., OUKESSOU M., SAADI, A., BOUSLIKHANE M., GAUCI C.G., LIGHTOWLERS M.W., KIRSCHVINK N. & MARCOTTY T. (2021). Control of cystic echinococcosis in the Middle Atlas, Morocco: Field evaluation of the EG95 vaccine in sheep and cesticide treatment in dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **15**, e0009253.

ALVAREZ ROJAS C.A., ROMIG T. & LIGHTOWLERS M.W. (2014). *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans – review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.*, **44**, 9–18.

BART J.M., MORARIU S., KNAPP J., ILIE M.S., PITULESCU M., ANGHEL A., COSOROABA I. & PIARROUX, R. (2006). Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol. Res.*, **98**, 130–137.

BOUBAKER G., MACCHIAROLI N., PRADA L., CUCHE M.A., ROSENZVIT M.C., ZIADINOV I., DEPLAZES P., SAARMA U., BABBA H., GOTSTEIN B. & SPILLOTIS M. (2013). A multiplexPCR 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.
- BOWLES J., BLAIR D. & McMANUS D.P., (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **54**, 165–173.
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- 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., GOTTSTEIN 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.
- FREY C.F., MARREROS N., RENNEKER S., SCHMIDT L., SAGER H., HENTRICH B., MILESI S. & GOTTSTEIN B. (2017). Dogs as victims of their own worms: Serodiagnosis of canine alveolar echinococcosis. *Parasit. Vectors*, **10**, 422.
- GAUCI C., JENKINS D. & LIGHTOWLERS M.W. (2011). Strategies for optimal expression of vaccine antigens from taeniid cestode parasites in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.*, **48**, 277–289.
- HEATH D.D. & KOOLAARD J. (2012). Serological monitoring of protection of sheep against *Echinococcus granulosus* induced by the EG95 vaccine. *Parasite Immunol.*, **34**, 40–44.
- KIM H.J., YONG T.S., SHIN M.H., LEE K.J., PARK G.M., SUVONKULOV U., KOVALENKO D. & YU H.S. (2017). Practical Algorithms for PCR-RFLP-Based Genotyping of *Echinococcus granulosus* *Sensu Lato*. *Korean J. Parasitol.*, **55**, 679–684. doi: 10.3347/kjp.2017.55.6.679.
- 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.
- KNAPP J., UMHANG G., POULLE M.L., MILLON L. (2016). Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 2950–2958. doi: 10.1128/AEM.03467-15.



- 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-time PCR 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.
- KINKAR L., LAURIMÄE T., SHARBATKHORI M., MIRHENDI H., KIA E.B., PONCE-GORDO F., ANDRESIUK V., SIMSEK S., LAVIKAINEN A., IRSHADULLAH M., UMHANG G., OUDNI-M'RAD M., ACOSTA-JAMETT G., REHBEIN S. & SAARMA U. (2017). New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto*. *Infect. Genet. Evol.*, **52**, 52–58. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.023.
- 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.
- LARRIEU E., MUJICA G., ARAYA D., LABANCHI J.L., AREZO M., HERRERO E., SANTILLAN G., VIZCAYCHIPKI K., UCHIUMI L., SALVITTI J.C., GRIZMADO C., CALABRO A., TALMON G., SEPULVEDA L., GALVAN J.M., CABRERA M., SELEIMAN M., CROWLEY P., CESPEDES G., GARCIA CACHAU M., GINO L., MOLINA L., DAFFNER J., GAUCI C.G., DONADEU M. & LIGHTOWLERS M.W. (2019). Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: 8 years of work. *Acta Trop.*, **191**, 1–7.
- LAURIMAE T., KINKAR L., MOKS E., ROMIG T., OMER R.A., CASULLI A., UMHANG G., BAGRADE G., IRSHADULLAH M., SHARBATKHORI M., MIRHENDI H., PONCE-GORDO F., SORIANO S.V., VARCASIA A., ROSTAMI-NEJAD M., ANDRESIUK V. & SAARMA U. (2018). Molecular phylogeny based on six nuclear genes suggests that *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6/G7 and G8/G10 can be regarded as two distinct species. *Parasitology*, **145**, 1929–1937. doi: 10.1017/S0031182018000719.
- LIGHTOWLERS M.W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology*, **133**, S27–42.
- LIGHTOWLERS M.W., LAWRENCE S.B., GAUCI C.G., YOUNG J., RALSTON M.J., MAAS D. & HEALTH D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol.*, **18**, 457–462.
- MA J.Y., WANG H., LIN G.H., ZHAO F., LI C., ZHANG T.Z., MA X., ZHANG Y.G., HOU Z.B., CAI H.X., LIU P.Y. & WANG Y.S. (2015). Surveillance of *Echinococcus* isolates from Qinghai, China. *Vet. Parasitol.*, **207**, 44–48.
- 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.
- MAKSIMOV P., BERGMANN H., WASSERMANN M., ROMIG T., GOTTSTEIN B., CASULLI A. & CONRATHS F.J. (2020). Species Detection within the *Echinococcus granulosus sensu lato* Complex by Novel Probe-Based Real-Time PCRs. *Pathogens*, **9**, 791. doi: 10.3390/pathogens9100791.
- 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.

POGGIO T.V., JENSEN O., MOSSELLO M., IRIARTE J., AVILA H.G., GERTISER M.L., SERAFINO J.J., ROMERO S., ECHENIQUE M.A., DOMINGUEZ D.E., BARRIOS J.R. & HEATH, D. (2016). Serology and longevity of immunity against *Echinococcus granulosus* in sheep and llama induced by an oil-based EG95 vaccine. *Parasite Immunol.*, **38**, 496–502.

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.

SANTOLAMAZZA F., SANTORO A., POSSENTI A., CACCIÒ S.M. & CASULLI A. (2020). A validated method to identify *Echinococcus granulosus* sensu lato at species level. *Infect. Genet. Evol.*, **85**, 104575. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104575.

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.

TORGERSON P.R. (2003). The use of mathematical models to simulate control options for echinococcosis. *Acta Trop.*, **85**, 211–221.

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.

WANG L., WANG Q., CAI H., WANG H., HUANG Y., FENG Y., BAI X., QIN M., MANGUIN S., GAVOTTE L., WU W. & FRUTOS R. (2021). Evaluation of fecal immunoassays for canine *Echinococcus* infection in China. *PLoS Negl Trop Dis.*, 15(3):e0008690. doi: 10.1371/journal.pntd.0008690. PMID: 33720943; PMCID: PMC7993806.

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 en la página web de la OIE:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

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 2022.