

Sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunoelectrotransferencia blot (EITB) para el diagnóstico de hidatidosis en ovinos

Sensitivity and specificity of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test (EITB) for the diagnosis of hydatidosis in sheep

Karina Bardales-Ortiz^{1,2,4}, Raúl Enríquez L.², Cesar Sedano H.², Saul J. Santivañez S.^{2,3}, Armando González Z.¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la prueba de inmunoelectrotransferencia blot (EITB) en el diagnóstico serológico de la hidatidosis ovina. Se trabajó con 80 ovinos Corriedale de la SAIS Pachacútec, Junín, Perú y se comparó los resultados con la necropsia (*Gold estándar*). La presencia simultánea de tres bandas antigénicas (8, 16 y 21 kDa) en el EITB fueron consideradas como un resultado positivo, en tanto que el resultado a la necropsia fue positivo si existía al menos un quiste a nivel del hígado o de los pulmones. El EITB evidenció una baja sensibilidad (31.2%) y una alta especificidad (100%). Así mismo, se obtuvieron valores predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de 100 y 5.4%, respectivamente, pero sin asociación significativa ($p=0.55$) entre el resultado de la prueba y la presencia de quistes. Para determinar la utilidad del EITB en la detección de quistes activos, se consideró como positivo la presencia de al menos una banda antigénica

¹ Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Centro de Salud Global, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Dirección de Investigación, Universidad Continental, Huancayo, Perú

⁴ E-mail: karinabardales@gmail.com

Recibido: 9 de marzo de 2021

Aceptado para publicación: 26 de noviembre de 2021

Publicado: 25 de febrero de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

y como quiste activo (infección activa) a aquella estructura que por sus condiciones macroscópicas podría contener células capaces de proliferar en condiciones adecuadas. Los resultados mostraron una alta sensibilidad (93.6%) de la prueba para identificar lesiones quísticas activas con VPP de 60.3% y VPN de 57.1%, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos ($p=0.439$). Los hallazgos evidencian que la reacción de la prueba de EITB no necesariamente es más sensible cuando hay presencia de quistes activos.

Palabras clave: hidatidosis ovina, prueba de EITB, quiste activo, sensibilidad, especificidad

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test (EITB) in the serological diagnosis of ovine hydatidosis. In total, 80 Corriedale sheep from SAIS Pachacútec, Junín, Peru, were used and the results compared with the necropsy (gold standard). The simultaneous presence of three antigenic bands (8, 16 and 21 kDa) in the EITB was considered a positive result, while the necropsy result was positive if there was at least one cyst in the liver or lungs. The EITB showed a low sensitivity (31.2%) and a high specificity (100%). Likewise, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of 100 and 5.4%, respectively, but without significant association ($p=0.55$) between the test result and the presence of cysts. To determine the usefulness of EITB in the detection of active cysts, the presence of at least one antigenic band was considered as positive and as an active cyst (active infection) the structure that, due to its macroscopic conditions, could contain cells capable of proliferating under adequate conditions. The results showed a high sensitivity (93.6%) of the test to identify active cystic lesions with PPV of 60.3% and NPV of 57.1%, although the results were not statistically significant ($p=0.439$). The findings show that the EITB test reaction is not necessarily more sensitive when active cysts are present.

Key words: ovine hydatidosis, EITB test, active cyst, sensitivity, specificity

INTRODUCCIÓN

En Perú, los programas de control y prevención de la hidatidosis basados en la inspección del proceso de beneficio del ganado y la desparasitación de perros no han logrado el éxito esperado debido a la constante reinfección que presentan los perros, ya que aún se mantiene la costumbre de alimentarlos con vísceras de animales infectados (Moro *et al.*, 1994, 1997; Santivañez *et al.*, 2010). Si bien, la desparasitación de los perros evita la infección de los ovinos, esto no logra redu-

cir la infección en ovinos previamente infectados; sin embargo, la desparasitación de estos puede disminuir la carga parasitaria calcificando algunos quistes (Blanton *et al.*, 1998). En ambos casos, los ovinos continúan actuando como reservorio de quistes activos, facilitando la propagación de la enfermedad (Dueger y Gilman, 2001).

En el afán de encontrar una herramienta serológica útil que permita diagnosticar la hidatidosis ovina, se estableció que la prueba de electroinmuno transferencia enzimática (EITB) o *Western blot* presenta una buena

sensibilidad (69-73%), especificidad (98.7%) y ausencia de reacciones cruzadas (Moro *et al.*, 1997; Dueger *et al.*, 2003), aunque se desconoce su efectividad para identificar una infección activa (presencia de quistes activos). Es por ello que, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la prueba de EITB en el diagnóstico serológico de la hidatidosis ovina en campo, dentro de una zona endémica, así como evaluar la utilidad de la prueba para detectar quistes activos con base a la presencia de al menos una banda antigénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución

El análisis de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, en Lima. La necropsia de los animales tuvo lugar en las instalaciones del Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) y en el Complejo Científico Ecológico Académico Santa María del Mar de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Material Experimental

Se trabajó con 84 ovinos Corriedale distribuidos en dos grupos. El Grupo I, conformado por 80 animales mayores de 3 años, adquiridos en la SAIS Pachacútec, Junín y trasladados a la ciudad de Lima, y el Grupo II conformado por cuatro ovinos menores de 1 año, nacidos en Lima bajo condiciones de laboratorio. A todos los animales se les tomó una muestra de sangre (8 ml) mediante punción de la vena yugular en tubos al vacío con gel separador y sin anticoagulante (Vacutainer®). Las muestras fueron centrifugadas a 635 g durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a un microvial, preservándose en cadena de frío (*Ice pack*) a 4 °C durante su

transporte hacia el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

Electroinmuno Transferencia Enzimática (EITB)

Preparación del antígeno

El antígeno hidatídico fue preparado según lo descrito por Verastegui *et al.* (1992), utilizando el fluido de quiste hidatídico bovino crudo obtenido de animales provenientes de un matadero de la ciudad de Lima. Brevemente, el líquido se trató con 0.5M de fluoruro de fenil metil sulfonilo a 4 °C en proporción de 1/100 y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró y dividió en alícuotas, congelándolas a -70 °C, para liofilizarlas y almacenarlas a -20 °C. La reconstitución del antígeno fue con solución salina tamponada con fosfato (PBS), diluyendo al antígeno con 0.1% de dodecilsulfato de sodio-0.025 (peso/volumen) de azul de bromofenol-Tris-HCl 0.0025 M (pH 8.0). Para obtener una concentración final de 100 µg/ml de proteína, se agregó glicerol al 6% y se calentó a 65 °C durante 10-20 min. El antígeno bovino identifica tres bandas de glicoproteínas (8, 16 y 21 kDa).

Procesamiento de la muestra

- *Electrotransferencia.* Corrida electroforética en gel de poliacrilamida para separar proteínas de la muestra. Se preparó un SDS-PAGE en base a un gel de 15 y 25%. Se sembraron las muestras de los 84 animales (75 µl por gel de la dilución del antígeno), colocándolas en una cámara de electroforesis durante 40 a 60 min. Este proceso permitió la distribución del antígeno en el gel.
- *Transferencia.* Aplicación de corriente eléctrica para llevar las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa. Se formaron cassettes apilando tapa negra, esponja, papel de filtro, membrana, gel, papel de nitrocelulosa, esponja, tapa transparente; los cuales fueron colocados en la cuba con transfer buffer y refrigerante,

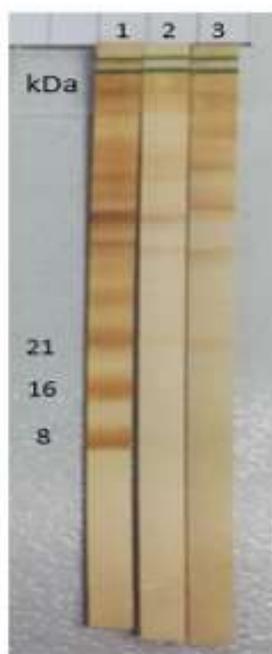


Figura 1. Tiras diagnósticas del EITB con bandas específicas de 8, 16 y 21kDa. Tira 1; las tres bandas se encuentran teñidas - positivo a hidatidosis. Las tiras 2 y 3 no reaccionaron a la tinción – resultado negativo

corriéndolos a 37mA durante 3 h en agitación. Luego se extrajo el papel de nitrocelulosa y se lavó con PBS-Tween. El pale fue cortado en tiras de 3 mm de ancho.

- *Incubación o Blot.* Las tiras de nitrocelulosa se sumergieron en las canaletas de incubación con solución bloqueadora (leche descremada al 5%) y la muestra de suero del animal, dejándolas incubar toda la noche en refrigeración y en agitación. Al día siguiente se realizaron cinco lavados con PBS-Tween, se agregó el conjugado 1:10000, incubando en movimiento por 2 h a temperatura ambiente. Se volvió a lavar y se agregó 500 µl de solución de coloración en PBS con peróxido de sodio y diaminobencidina (DAB), dejando reaccionar por 10 min para volver a lavar tres veces con agua. Las tiras fueron secadas para proceder a su lectura.

Los resultados de la prueba de EITB se determinaron mediante la observación del número de bandas coloreadas en las tiras de nitrocelulosa. La tinción simultánea de las tres bandas antigénicas asociadas (8, 16, 21 KDa) indicaron un resultado positivo a hidatidosis (Figura 1), en tanto que la presencia de dos bandas o menos indicó un resultado negativo.

Necropsia

Se estableció a la necropsia como Gold estándar para el diagnóstico confirmatorio de la hidatidosis ovina. Todos los ovinos fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de xilacina (0.2 mg/kg) y ketamina (20 mg/kg) y sacrificados con pentobarbital sódico intravenosos (60 mg/kg). El hígado y los pulmones fueron aislados para determinar la presencia de larvas de *Taenia ovis* y metacestodos de *Taenia hydatigena* (*Cysticercus tenuicollis*); asimismo, se inspeccionaron los órganos abdominales en busca de tenias o lesiones por estas. Se examinaron todos los quistes encontrados, registrando el número, ubicación, diámetro y tipo. Los animales con al menos una lesión quística a nivel del hígado o de los pulmones fueron considerados como positivos (Cuadro 1).

Basados en las características macroscópicas descritas por Dueger *et al.* (2013) con algunas modificaciones, los quistes se clasificaron en activos e inactivos. Los quistes activos presentaban forma ovoide, llenos de líquido transparente y contenían protoescoléx liberados, que formaban la «arenilla hidatídica» (Figura 2) (Dueger y Gilman, 2001; Dueger *et al.*, 2003). Los quistes inactivos eran de tipo degenerado si presentaban capas adventicias ennegrecidas con una o múltiples cámaras llenas o no de material purulento y con o sin una membrana degradada (Figura 3) o de tipo calcificado si presentaban una consistencia dura al corte con depósitos calcificados calcáreos en la pared (Figura 4) (Dueger y Gilman, 2001; Dueger *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Criterio diagnóstico para hidatidosis ovina

Criterio diagnóstico	Análisis general		Análisis estratificado	
	Prueba EITB	Necropsia	Prueba EITB	Necropsia
Positivo	Presencia de 3 bandas (8, 16 y 21 kDa)	Presencia de lesiones quísticas	Al menos una banda (16 o 21 kDa)	Quistes activos: <ul style="list-style-type: none"> - una cámara - líquido - membrana blanco-nacarado - arenilla hidatídica
Negativo	Presencia de 2 o menos bandas	Ausencia de lesiones quísticas	Ausencia de bandas	Quistes inactivos: <ul style="list-style-type: none"> - Degenerados - Calcificados - Ausencia de quistes

EITB: electroinmuno transferencia enzimática

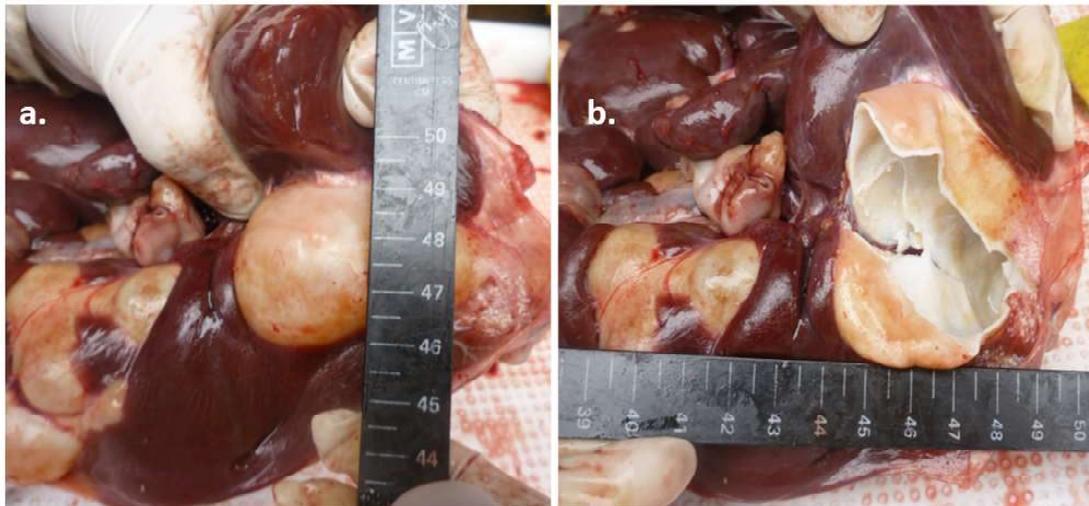


Figura 2. Características de un quiste hidatídico hepático activo: quiste de 4 cm de diámetro. (a) Vista externa: forma esférica, lleno de contenido líquido. (b): Vista interna: membrana de color blanco nacarado, presencia de una sola cámara

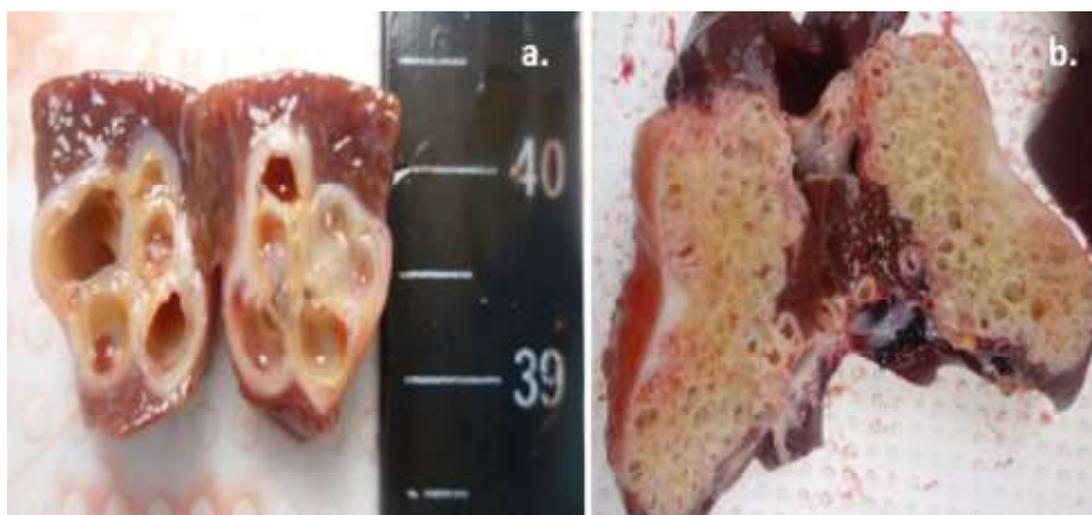


Figura 3. Características de un quiste hidatídico hepático inactivo degenerado. (a): Quiste hepático con varias cámaras, membrana de coloración amarillenta y escaso contenido líquido. (b): Quiste hepático con múltiples cámaras, no contiene líquido, cámaras formando trabéculas

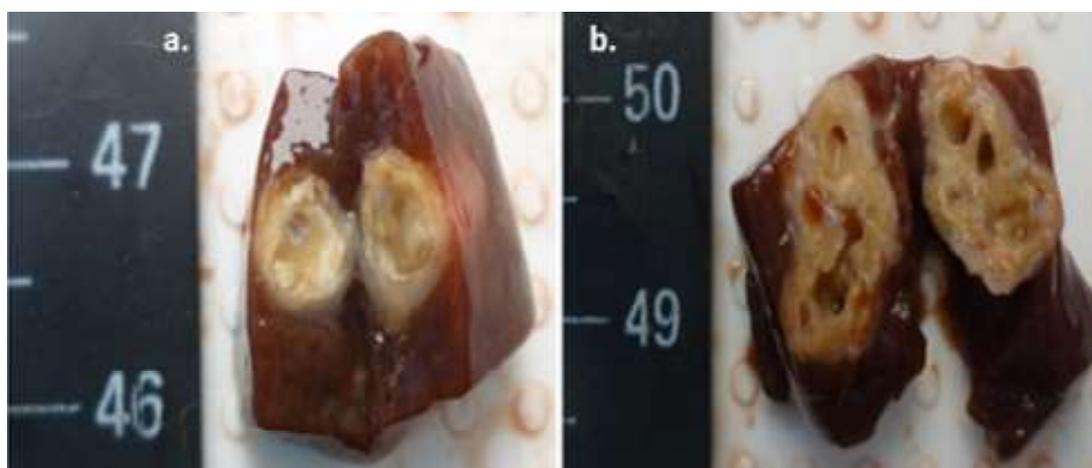


Figura 4. Características de un quiste hidatídico hepático inactivo calcificado. (a): Quiste hepático con una sola cámara, membrana engrosada con depósitos calcáreos. (b): Quiste hepático con varias cámaras, membrana engrosada

Cuadro 2. Resultado de la prueba de electroinmuno transferencia (EITB) en muestras sanguíneas de ovinos para detección de hidatidosis ovina según el tipo de banda encontrada

Bandas	Bandas EITB (kDa)	Observaciones	
		n	%
3	21-16-8	24	30.0
	16 y 8	2	2.5
2	21 y 8	10	12.5
	21 y 16	8	10.0
	Solo 8	2	2.5
1	Solo 16	3	3.8
	Solo 21	24	30.0
0	Ninguna	7	8.8
Total		80	100.0

Cuadro 3. Ovinos positivos en la necropsia a quistes hidatídicos (n=80), Junín, Perú

Órgano	Tipo de quiste	Ovinos	
		n	%
Pulmón	Activo	41	54.7
	Inactivo	34	45.3
Hígado	Activo	26	36.6
	Inactivo	45	63.4

Por otro lado, a fin de conocer la relación entre las bandas de la prueba de EITB y los hallazgos a la necropsia, se consideró el EITB positivo con la presencia de al menos una de las bandas de glicoproteínas y la necropsia positiva con la presencia al menos una lesión quística activa (en hígado o pulmones) (Cuadro 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bandas en la Prueba de EITB

La prueba de EITB indicó que, de los 80 sueros ovinos del Grupo I, 24 (30%) marcaron positivo a tres bandas, 20 (25%) a dos bandas, 29 (36.25%) a una banda y 7 (8.75%) a cero bandas (Cuadro 2). La mayor frecuencia de reacción fue ejercida por la banda de 21 kDa, que según Verastegui *et al.* (1992), es altamente específica para hidatidosis. En este sentido, Miranda *et al.* (2010) consideró como específicas a las bandas 25 y 31 kDa, pero Moro *et al.* (1997) y Jeyathilakan *et al.* (2011) consideran como más específica a la banda 8 kDa.

La diferencia en la presentación de las bandas puede deberse al tipo de antígeno empleado (ovino, bovino, porcino, etc.), ya que el mismo parásito puede expresar proteínas distintas según el hospedero; además, existe la posibilidad de presentarse diversas cepas de *Echinococcus granulosus* (Gomez, 2004). Tal es el caso que Miranda *et al.* (2010, 2013) identificaron seis bandas en antígeno porcino (8, 16, 21, 25, 31 y 45 KDa) y cuatro en antígeno de alpaca (8, 16, 32 y 38 KDa). En forma similar, al usar antígeno bovino, Verastegui *et al.* (1992) identificaron las bandas 8, 16 y 21 KDa, mientras que Miranda *et al.* (2010) identificaron las bandas 8, 16, 32 y 35 KDa.

Necropsia

Un total de 77 ovejas del Grupo I presentaron al menos una lesión quística, ya sea a nivel del hígado o de los pulmones (96.3%), cifra similar al 98.9% reportada por Villarreal (2007) en el la SAIS Tupac Amaru en Junín. Este resultado evidencia que a pesar de los años y de las medidas preventivas adoptadas, las cifras de ovinos infectados se mantienen elevadas, colocando al departamento de Junín como uno de los más endémicos a hidatidosis, poniendo en riesgo la salud de las personas.

Cuadro 4. Sensibilidad y especificidad de la prueba de electroinmuno transferencia (EITB) para el diagnóstico de hidatidosis ovina en comparación con los hallazgos de quistes hidatídicos en la necropsia

Resultado EITB	Resultado a la necropsia		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	24 (31.2%)	0 (0%)	24 (30.0%)
Negativo	53 (68.8%)	3 (100.0%)	56 (70.0%)
Total	77	3	80

Fisher's exact = 0.550

1-sided Fisher's exact = 0.337

En los 77 animales se contabilizaron 859 quistes hidatídicos, siendo 241 activos. De este grupo de animales, 75 presentaron quistes a nivel del pulmón, siendo 41 (54.7%) y 26 (36.6%) con quistes activos en pulmón e hígado, respectivamente (Cuadro 3). No se encontraron larvas de *Taenia hydatigena* (*Cysticercus tenuicollis*) o *Taenia ovis*, ni lesiones ocasionadas por estos parásitos en los órganos del sistema digestivo.

El número de quistes fue mayor en los pulmones que en el hígado. Lo cual concuerda por otros estudios ((Dueger y Gilman, 2001; Urquart *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2003); sin embargo, García *et al.* (1997) reportaron una ligera diferencia a favor de lesiones quísticas en hígado (46.2%) que en pulmones (43%). La presencia de un mayor número de animales con lesiones quísticas y quistes activos en pulmón podría deberse a la menor respuesta inmune de este órgano en comparación con el hígado ((Hariri *et al.*, 1965; Musiani *et al.*, 1978). También podría relacionarse a una variación del genotipo de *E. granulosus* con predisposición por los pulmones, asociado al incremento en la dila-

tación capilar y volumen sanguíneo de los pulmones como resultado a la adaptación a grandes altitudes (Lahiri, 1977; Guerra y Breña, 2015) o a una variación morfológica del parásito, si se considera que los ganchos de los protoescolices en pulmones de ovinos y bovinos son más largos que de aquellos en el hígado (Almeida *et al.*, 2007).

Sensibilidad y Especificidad del EITB

Se elaboró una tabla de doble entrada para comparar los resultados obtenidos en la prueba de EITB con los resultados de la necropsia para los 80 animales del Grupo I (Cuadro 4). La validez interna de la EITB evidenció una sensibilidad de 31.2%, valor bajo comparado con los rangos de 69 y 92.5% obtenidos en estudios similares (Moro *et al.*, 1997; Dueger *et al.*, 2003; Simsek y Koroglu, 2004; Miranda, 2010; Jeyathilakan *et al.*, 2011) y una especificidad del 100% en la prueba. Los valores predictivos positivo y negativos fueron de 100 y 5.4%, respectivamente; sin embargo, los resultados no mostraron una asociación significativa ($p=0.337$).

Cuadro 5. Sensibilidad y especificidad de la prueba de electroinmuno transferencia enzimática (EITB) con relación a la presencia de al menos un quiste hidatídico activo en ovinos (Junín, Perú)

Resultado EITB	Quistes activos	Quistes inactivos	Total
Positivo (al menos una banda)	44 (93.6%)	29 (87.9%)	73 (91.2%)
Negativo (ausencia de bandas)	3 (6.4%)	4 (12.1%)	7 (8.8%)
Total	47	33	80

Fisher's exact = 0.439

1-sided Fisher's exact = 0.307

La sensibilidad estimada de la prueba a nivel de los pulmones (32%) y del hígado (33.8%) fue similar. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Moro *et al.* (1997) a nivel del pulmón (33%), pero difieren para la sensibilidad a nivel de hígado (52%). Al respecto, las diferencias encontradas podrían estar relacionadas al tamaño de la muestra o a la presencia de falsos negativos (Dueger *et al.*, 2003). La especificidad encontrada fue de 100%, tanto en hígado como en pulmones, valor similar a otros reportes con valores que varían entre 95.3 y 99.3% (Moro *et al.*, 1997; Miranda, 2010; Jeyathilakan *et al.*, 2011; sin embargo, se tienen reportes con sensibilidades menores, tales como de 38% (Dueger *et al.*, 2003; Simsek y Koroglu, 2004) en muestras de áreas endémicas de características similares a la zona de estudio.

Sensibilidad del EITB con Quistes Activos

El criterio empleado para detectar quistes activos mediante la prueba de EITB basado en la identificación de al menos una de las tres bandas antigénicas (8, 16 o 21 kDa) resultó con una sensibilidad de 93.6% (Cuadro 5). Este valor se asemeja al obtenido en otros estudios en ovinos con 91.4% de sensibilidad (Dueger *et al.*, 2003) y en humanos

de 95.7% (Gadea *et al.*, 2000). Los valores predictivos positivo y negativo fueron de 60.3 y 57.14%, respectivamente; pero sin llegar a mostrar una asociación significativa ($p=0.307$).

Evaluar el efecto de la ubicación del quiste activo en la sensibilidad de la prueba fue difícil, ya que los animales presentaban lesiones quísticas activas a nivel del hígado y pulmones de manera simultánea. Así, para realizar este análisis los quistes se estratificaron según el órgano, encontrándose una sensibilidad en hígado de 96.2% y en pulmones de 92.7%. Estos valores se asemejan a la sensibilidad estimada de 95.7% reportada por Gadea *et al.* (2000). No obstante, la prueba de Fisher evidenció que no existe asociación significativa entre la presencia de lesiones quísticas activas a nivel del hígado ($p=0.533$) o de pulmones ($p=0.569$) con el resultado en la prueba de EITB.

Es importante tener en cuenta que la eficacia de las pruebas serológicas depende de muchos factores, algunos de ellos asociados a la procedencia y pureza del antígeno empleado, al suero seleccionado, al órgano afectado (hígado o pulmones), al número de quistes, al tipo de quiste, a la respuesta inmunitaria del hospedero y al hospedero pro-

piamente dicho (Virginio *et al.*, 2003; Carmena *et al.*, 2007). Así mismo, los antígenos extraídos del líquido hidatídico presentan una naturaleza bioquímica compleja que genera problemas en su estandarización debido a la baja sensibilidad y especificidad (Irabuena *et al.*, 2000; Liance *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

- La prueba de electroinmuno transferencia enzimática (EITB) para el diagnóstico serológico de hidatidosis ovina presentó baja sensibilidad (31.2%) y alta especificidad (100%).
- La sensibilidad de la prueba EITB a la presencia de al menos una banda para detectar animales con lesiones quísticas activas evidenció una alta sensibilidad (93.6%).
- La sensibilidad de la prueba de EITB para detectar lesiones quísticas en el hígado (96.2%) y en pulmones (92.7%) fue relativamente similar.
- En la prueba de EITB, la banda 21 kDa fue más específica en el diagnóstico serológico de la hidatidosis ovina.

Agradecimiento

Al Training Grant TW001140 del National Institutes of Health (NIH) «Training in infectious diseases», así como al Grant N.º R01AI116470-01A1 «Liver cystic echinococcosis: pre-clinical assessment of a novel, single step percutaneous treatment procedure (intracystic albendazole sulfoxide injection)» del National Institutes of Health (NIH) por el financiamiento brindado para la realización del presente estudio y al Grupo de trabajo en hidatidosis.

LITERATURA CITADA

1. Almeida FB, Rodrigues-Silva R, Neves RH, Romani EL, Machado-Silva JR. 2007. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* in livestock from Peru. *Vet Parasitol* 143: 50-58. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.028
2. Blanton RE, Wachira TM, Zeyhle EE, Njoroge EM, Magambo JK, Schantz PM. 1998. Oxfendazole treatment for cystic hydatid disease in naturally infected animals. *Antimicrob Agents Ch* 42: 601-605. doi: 10.1128/AAC.42.3.601
3. Carmena D, Benito A, Eraso E. 2007. Recent advances in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25: 263-269. doi: 10.1157/13100468
4. Dueger E, Gilman R. 2001. Prevalence, intensity, and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central Peruvian Andes. *T Roy Soc Trop Med H* 95: 379-383. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90188-9
5. Dueger E, Verastegui M, Gilman R. 2003. Evaluation of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for ovine hydatidosis relative to age and cyst characteristics in naturally infected sheep. *Vet Parasitol* 114: 285-293. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00128-6
6. Gadea I, Ayala G, Diago M, Cuñat A, García J. 2000. Immunological diagnosis of human hydatid cyst relapse: utility of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and discriminant analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 549-552. doi: 10.1128/cdli.7.4.549-552.2000
7. García JL, Álvarez AI, Redondo PA, Prieto JG. 1997. Estudio de la fertilidad y viabilidad de quistes hidatídicos ovinos. *Rev Esp Salud Pública* 71: 445-449.
8. Gomez J. 2004. Valor diagnóstico de inmunoblot con líquido hidatídico humano, frente a antígeno ovino y bovino *Rev Mex Patol Clin* 51: 75-89.
9. Guerra L, Breña M. 2015. Hidatidosis humana en el Perú. *Apuntes de Ciencia y Sociedad* 5: 19-21. doi: 10.18259/acs.2015015
10. Hariri MN, Schwabe CW, Koussa M. 1965. Host-parasite relationships in echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg* 14: 592-604. doi: 10.4269/ajtmh.1965.14.592

11. **Irabuena O, Nieto A, Ferreira AM, Battistoni J, Ferragut G. 2000.** Characterization y optimization of bovine *Echinococcus granulosus* cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42: 255-262. doi: 10.1590/s0036-46652000000500004
12. **Jeyathilakan N, Abdul S, John L, Chandran DJ, Raj GD. 2011.** Development and evaluation of flow through technique for diagnosis of cystic echinococcosis in sheep. *Vet Parasitol* 180: 250-255. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.-03.030
13. **Lahiri S. 1977.** Physiological responses y adaptations to high altitude. *Int Rev Physiol* 15: 217-251. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.030
14. **Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R y Piarroux R. 2000.** Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: confirmatory testing y species differentiation by a new commercial Western Blot. *J Clin Microbiol* 38: 3718-3721. doi: 10.1128/JCM.38.-10.3718-3721.2000
15. **Martinez M, Galarza E, Rodriguez J, Leguía G, Montes G. 2003.** Prevalencia y fertilidad de quistes hidatídicos en ovinos de raza Junín y echinococcosis canina en una ganadería de la sierra central del país. *Rev Peru Parasitol* 1: 14-17.
16. **Miranda E, Velarde F, Somocurcio J, Ayala E. 2010.** Evaluación de dos pruebas de inmunoblot con antígeno hidatídico de caprino y ovino para el diagnóstico de equinococosis humana. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 27: 209-214.
17. **Miranda E, Ayala-Sulca E, Flores H. 2013.** Evaluación del Western blot con cinco antígenos hidatídicos para el diagnóstico de equinococosis humana. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 30: 344-364.
18. **Moro P, Guevara A, Verastegui M, Gilman RH, Poma H, Tapia B, Garcia HH, et al. 1994.** Distribution of hydatidosis and cisticercosis in different Peruvian populations as demonstrated by an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay. *Am. J Trop Med Hyg* 51: 851-855. doi: 10.4269/ajtmh.1994.-51.851
19. **Moro P, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V, Lescano G, et al. 1997.** Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the Central Peruvian Andes. *Bull World Health Org* 75: 553-561.
20. **Moro P, Verastegui M, Gilman RH, Falcon N, Bernal T, Gavidia C, Gonzalez A, et al. 1997.** Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of hydatidosis (*Echinococcus granulosus*) in sheep. *Vet Rec* 140: 605-606. doi: 10.1136/vr.140.23.605
21. **Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E, Pozzuoli R. 1978.** *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *J Clin Pathol* 31: 475-478. doi: 10.1136/jcp.31.5.475
22. **Santivañez SJ, Naquira C, Gavidia CM, Tello L, Hernandez E, Brunetti E, Kachani M, et al. 2010.** Household factors associated with the presence of human hydatid disease in three rural communities of Junin, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 27: 498-505. doi: 10.1590/s1726-46342010000400002
23. **Simsek S, Koroglu E. 2004.** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) y enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. *Acta Trop* 92: 17-24. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.04.006
24. **Urquart G, Armour J, Duncan L. 2001.** Parasitología veterinaria. España: Acribia. 146 p.
25. **Verastegui M, Moro P, Guevara A, Rodriguez T, Miranda E, Gilman RH. 1992.** Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of

- human hydatid disease. *J Clin Microbiol* 30: 1557-1561. doi: 10.1128/jcm.30.6.-1557-1561.1992
26. **Villarreal L. 2007.** Asociación de oxfendazol y nitazoxanida como tratamiento contra hidatidosis en ovinos naturalmente infectados. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 68 p.
27. **Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zyoni AF, Nieto A, Zaha A, et al. 2003.** A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 132: 309-315. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02123.x