

DIAGNOSTICO DE LA SARCOSPORIDIOSIS OVINA CON LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Por P. Díez Baños,
M. Cordero del Campillo y
F. A. Rojo Vázquez

INTRODUCCION

Comprobada la elevada frecuencia de la parasitación por sarcosporidios, de modo especial en ovejas, cerdos y vacas, así como el carácter zoonósico de alguna de las especies de sarcosporidios, se plantea la conveniencia de poseer medios de diagnóstico adecuados, en particular aquellos a realizar en vida, representados, sobre todo, por pruebas serológicas.

El punto de partida de estos estudios, es la evidencia de que, en animales experimentales, inoculados con repetidas dosis de contenido quístico, se producen respuestas anticuerpo, detectables por pruebas serológicas^{2, 3, 4, 7, 8, 10, 20, 21, 25}. En este sentido, hay que añadir la ventaja que supone el estudio y perfeccionamiento de las técnicas serológicas utilizadas en la detección de anticuerpos debidos a toxoplasmas, algunas de las cuales son de aplicación similar en los sarcosporidios. Entre éstas ocupa lugar destacado la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Ante las ventajas que distintos autores^{6, 8, 9, 13, 26} señalan para IFI, frente a otras técnicas serológicas, se ha venido estudiando como método capaz de evidenciar anticuerpos debidos a infecciones por sarcosporidios, si bien, no están resueltos por completo detalles como la obtención de antígenos que eviten la aparición de fluorescencias inespecíficas, ni la relación existente entre los títulos y el grado de infección^{3, 7, 12, 14, 18, 23, 27, 29, 30}.

Teniendo presente esta problemática, llevamos a cabo un estudio sobre el empleo de la IFI en la detección de respuestas anticuerpo frente a la sarcosporidiosis, en sueros ovino, contrastando estos resultados con los de la demostración directa de la parasitación muscular, en esos mismos animales.

MATERIAL Y METODOS

El material utilizado en nuestro trabajo consistió en 366 sueros ovinos, a los que agrupamos, según su edad, como se expresa en el Cuadro 1. No se consideró ningún tipo de antecedentes clínicos, a excepción del grado de parasitación por macro o microquistes de sarcosporidios.

CUADRO 1
División de los ovinos muestrados de acuerdo con su edad.

Edad	N.º muestras
Grupo I (mayores de dos años)	114
Grupo II (entre uno y dos años)	43
Grupo III (entre seis meses y un año)	62
Grupo IV (entre tres y seis meses)	37
Grupo V (menores de tres meses)	110

El antígeno los obtuvimos siguiendo, en parte, la pauta marcada por AMBROISE-THOMAS¹, para la obtención del antígeno en el caso de toxoplasmas y, por otro lado, la técnica de BORDJOCHKI y col.^{8, 9, 10, 11}, aplicada al caso concreto de los sarcosporidios.

Los puntos fundamentales en la obtención de este antígeno fueron:

- Aislamiento cuidadoso de macroquistes de esófagos ovinos y repetidos lavados en solución salina fisiológica.
- Destrucción mecánica de los quistes y suspensión, de los zoitos liberados, en solución tampon (pH = 7,3); varios lavados seguidos de centrifugado, llevando el material resultante a una concentración aproximada de 3.000 zoitos por ml.
- Depósito de una gota de esta solución, en los espacios delimitados en portaobjetos, de modo que se observaran entre 10 y 15 zoitos por campo microscópico.
- Previo secado se conservó en congelador a -30°C.

Dado que la lectura de resultados se ve directamente influida por el modo de obtención del antígeno, no realizamos la técnica modificada por BORDJOCHKI y col.⁷, basada en la liofilización de este material antigénico, porque, aunque los zoitos conservan sus propiedades antigénicas, la destrucción de un número muy considerable de los mismos, lleva consigo una apreciable cantidad de detritus, de difícil eliminación y, con ello, la lectura imprecisa de estas reacciones. Por otra parte, contábamos con cantidad suficiente de material antigénico, que podíamos obtener en idénticas condiciones y que conservábamos en congelador, por espacio nunca superior al mes.

Como conjugado empleamos el preparado comercial del Instituto Pasteur «serum fluorescent de lapin antiglobulines Ig de mouton». Después de consul-

tados diversos trabajos^{5, 7, 8, 9, 10, 11} y, asimismo, tras varios ensayos, realizados con sueros positivos y negativos, para titular el conjugado, la dilución que ofreció resultados óptimos fue 1/20.

La realización práctica de la técnica de IFI fue paralela a la que se viene desarrollando para *Toxoplasma*^{1, 8}, aunque no siempre empleamos el contracolorante azul de Evans, que propugnan algunos autores, puesto que consideramos que podía enmascarar alguna reacción débilmente positiva, mientras que, para un observador habituado, su empleo no parece representar una ventaja sustancial.

La lectura de resultados se realizó con el microscopio de fluorescencia LEITZ-WETZLAR ORTHOLUX, provisto del siguiente material óptico: Condensador de fondo oscuro, apertura numérica 0,80, para objetivo a seco. Objetivo apocromático de 40/0,95 y oculares periplan 10 X, de campo visual normal. Filtros excitadores BG-38, BG-12 y difusor. Filtro bloqueador K-530.

En esta lectura se consideraron reacciones positivas cuando se comprobó fluorescencia alrededor de toda la membrana del zoito y, en especial, en la zona del núcleo, pudiendo extenderse a todo el zoito en las fuertemente positivas. Por el contrario, se consideró negativa cuando no existió tal fluorescencia o si solamente era patente en la zona del conoide. A cada suero se le dio el título correspondiente a la dilución límite a la que se comprobó fluorescencia.

En cuanto al título significativo, hay autores que lo consideran, incluso, a 1/20^{5, 8}.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 2, indicamos los resultados del empleo de esta técnica en los sueros correspondientes. El número de sueros positivos se expresa exclusivamente en función de los títulos límite, sin incluir las positividades del mismo suero a títulos menores.

CUADRO 2
Positividad para IFI en los 366 sueros ovinos estudiados.

Dilución	Sueros positivos	Porcentaje (sobre los 366 sueros)
1/20	35	9,56 %
1/40	73	19,94 %
1/80	65	17,75 %
1/160	47	12,84 %
1/320	17	4,64 %
≥1/500	18	4,90 %

En el Cuadro 3, señalamos la relación existente entre los resultados de la IFI y la parasitación muscular por sarcosporidios. Destaca el hecho de que la concordancia, positivos para IFI con quistes y, negativos sin ellos, no es completa, existiendo una ligera discordancia, incluso a títulos iguales o superiores a 1/500.

CUADRO 3
Relación entre IFI y la parasitación muscular.

Diluciones	CONCORDANTES			DISCORDANTES					
	IFI positiva		IFI negativa	TOTAL	IFI positiva		IFI negativa	TOTAL	
	Con macroquistes	Con microquistes	Sin quistes	%	Sin quistes	Con macroquistes	Con microquistes	%	
< 1/20	—	—	97	87,38	—	5	9	12,62	
1/20	7	21	—	80,00	7	—	—	20,00	
1/40	18	44	—	84,93	11	—	—	15,07	
1/80	21	42	—	96,92	2	—	—	3,08	
1/160	22	24	—	97,87	1	—	—	2,13	
1/320	8	9	—	100	0	—	—	0	
≥ 1/500	0	17	—	94,45	1	—	—	5,55	

De este cuadro se desprende que títulos de IFI iguales o superiores a 1/40, cuentan con muchas posibilidades de pertenecer a animales parasitados por sarcosporidios. Por otra parte, la discordancia, a partir de 1/40, se centra en los que no poseen quistes a nivel del músculo esofágico. En estos casos, la falta de coincidencia pudo deberse a que los quistes pasaran inadvertidos, bien por ser muy pequeños y hallarse, en escaso número, bien porque su localización fuera exclusiva en músculos no examinados.

Los discordantes, que son negativos para IFI, pero que se hallaron parasitados, fueron 14, la mayor parte de los cuales cuentan con microquistes. Por tanto, podemos afirmar que, cuando los sueros estudiados sean negativos para IFI, no se puede excluir, por completo, la posible presencia en esos ovinos de microquistes, aunque esa posibilidad no se cifre en un porcentaje elevado, puesto que, considerando los resultados globales, supone tan sólo el 3,8 %.

En los Cuadros 4 y 5 exponemos los resultados de la IFI, detallando animales mayores y menores de un año. Se deduce de ellos que los casos discordantes, positivos para IFI y sin quistes, son más abundantes en los menores de un año, y generalmente con títulos inferiores a 1/40. La interpretación de estos resultados discordantes, quizás resida en la posibilidad de que la respuesta al estímulo antigénico, provocada por la infección por sarcosporidios, se manifieste sin que necesariamente se patentice la parasitación en ese momento.

CUADRO 4
Resultados de IFI en sueros de ovinos mayores de 1 año y su relación con la parasitación por *Sarcocystis* spp.

Dilución	N.º de animales positivos	Parasitados por:		Sin parasitar
		Macroquistes	Microquistes	
< 1/20	10	5	4	1
1/20	12	7	4	1
1/40	38	18	19	1
1/80	42	21	21	0
1/160	37	22	14	1
1/320	16	8	8	0
≥ 1/500	2	0	2	0

CUADRO 5
Resultados de IFI en sueros de ovinos menores de un año y su relación con la parasitación por *Sarcocystis* spp.

Dilución	N.º de animales positivos	Parasitados por:		Sin parasitar
		Macroquistes	Microquistes	
< 1/20	101	0	5	96
1/20	23	0	17	6
1/40	35	0	25	10
1/80	23	0	21	2
1/160	10	0	10	0
1/320	1	0	1	0
≥ 1/500	16	0	15	1

En cambio, es en los mayores de un año y, de manera especial en los que sólo poseen microquistes, donde hay mayor discordancia en relación a los negativos para IFI. Aunque ese porcentaje no sea muy elevado no hay una interpretación clara de lo que sucede. Puede ser el resultado de un estímulo antigénico insuficiente, en los que sólo poseen microquistes, o un estímulo antiguo, en el caso de los parasitados por macroquistes con cierta antigüedad. A este respecto BORDJOCHKI y col.⁸, encuentran reacciones dudosas que atribuyen al comienzo de la respuesta anticuerpo y, en contraposición a ello, los cobayos tardaban relativamente pocos días en manifestar la respuesta anticuerpo detectable por IFI. Sin embargo, en este caso se trata de inoculaciones repetidas con material antigénico, mientras que la infección natural de los ovinos parece revestir un carácter más esporádico y menos intenso y, en consecuencia, la aparición de este tipo de respuesta debe ser más tardía.

Por otra parte, a pesar de que las propiedades antigénicas de los sarcosporidios no son conocidas con exactitud, se supone que, en los animales con macroquistes, el estímulo antigénico se realizó tiempo atrás y que el nivel de respuestas ha podido descender, de forma especial cuando no ha habido reinfecciones.

Destaca, además, la existencia de macro y microquistes, en los ovinos mayores de un año, tanto a títulos altos como más bajos, lo que corrobora nuestra idea de que no hay una dependencia muy estrecha entre el título y la parasitación por uno u otro tipo de quistes. En todo caso, cabe señalar que, en los ovinos menores de un año no se evidenció parasitación por macroquistes, muy posiblemente debido a su corta edad.

Nuestros resultados y su coincidencia con la parasitación muscular, no están totalmente de acuerdo con los obtenidos por otros autores¹⁹, que han estudiado estos aspectos en el cerdo, hallando porcentajes de positividad similares, entre IFI y la parasitación, cuando los títulos eran 1/20 mientras que esa coincidencia desciende a 81,5 %, a 1/200, bajando más por encima de 1/1.000. Algo similar sucedió en los estudios sobre ganado vacuno.

Coincidimos con TADROS y col.³¹, en que los sueros de animales de poca edad, no son positivos por no haber tenido la oportunidad de ser estimulados convenientemente. En cambio, los sueros de animales adultos arrojaron porcentajes altos de reacciones positivas. Más concretamente, cuando consideramos sueros de ovinos, positivos para IFI y con quistes musculares, relacionándolo con su edad, observamos que en el grupo I hubo un número elevado de positivos; los grupos II y III, fueron similares en sus reacciones positivas, e inferiores a las del grupo I, mientras que en el grupo IV la positividad experimentó un descenso muy pronunciado y, finalmente, en el grupo V, fue prácticamente nula.

En este sentido, aunque en el caso de la toxoplasmosis^{17, 26}, parece deducirse que pueden pasar anticuerpos de la madre al feto, si bien se ha observado que sólo en casos aislados²², en la sarcosporidiosis se ha demostrado la falta de anticuerpos en fetos y animales recién nacidos, cuyas madres estaban parasitadas, generalmente con mucha intensidad^{29, 31}.

Por otra parte, hay que señalar que, tomando en cuenta la intensidad de la positividad para IFI y su relación con la cantidad de zoítos gramo de músculo digerido, se cumple generalmente que, dentro del grupo de positivos que presentan sólo microquistes, hay un predominio de los que poseen títulos altos y, a la vez, mayor número de zoítos por gramo. Concretamente, se observa que los positivos a 1/20 tienen menos de 100 mil zoítos/g; entre los positivos a 1/40 y 1/80, predominan los que poseen entre 100 y 500 mil zoítos/g y, por último, los positivos con títulos superiores a 1/80 tienen más de 500 mil zoítos/g. Otros autores¹⁹ también comprueban una relación entre la intensidad de la fluorescencia y el grado de infección.

En definitiva, los resultados obtenidos mediante IFI nos permitirán comentar la intensidad de la infección por sarcosporidios, aunque no podamos concretar, por el momento, el estado de la misma, puesto que no conocemos exactamente la cinética de la respuesta en anticuerpos, ni podemos afirmar, de modo totalmente seguro, que sea factible establecer una relación entre los

títulos detectados por IFI y el grado de parasitación muscular. Sin embargo, si se comprueba una respuesta inmunitaria en la mayor parte de los animales estudiados que, a la vez, estaban parasitados. Este grado de eficacia global fue del 90 %.

Quizá una sola muestra sérica no proporcione toda la información deseada sobre el estado de la infección, pero varias lecturas, en diferentes momentos de la vida del animal, podrían proporcionar información más detallada.

Conocida la elevada especificidad que se atribuye a la IFI, en el caso de toxoplasmosis, podríamos suponer que en la sarcosporidiosis se mantuviera y que no existiesen reacciones cruzadas con otros protozoos muy afines. Nosotros hemos realizado IFI, frente a zoítos de *Sarcocystis tenella*, en 20 sueros ovinos, en los que previamente se habían observado títulos positivos para toxoplasmas, superiores a 1/1.000 y 1/2.000, y en ningún caso obtuvimos títulos superiores a 1/40. Esto contribuye a demostrar, cuando menos, la falta de relación entre los respectivos títulos de toxoplasmas y sarcosporidios, e incluso, las limitadas posibilidades de que existan reacciones cruzadas a diluciones superiores a 1/40. Coincidirían estos resultados con experiencias más amplias^{3, 12, 14, 15, 27, 28, 30}, en las que se ha confirmado la ausencia de reacciones cruzadas entre sarcosporidios y toxoplasmas. Por su parte, PEREIRA y col.²⁴, en sueros de cerdos, observan inmunidad cruzada entre *S. tenella*, *S. muris* y *T. gondii* (especialmente a 1/20), siendo más pronunciada entre las *Sarcocystis* spp. entre sí, que con *Toxoplasma*. En cambio, en ganado caprino, se ha mencionado IFI como una técnica muy sensible¹⁶. A este respecto, otros trabajos²⁹ demuestran que *Sarcocystis* y *Frenkelia* son prácticamente indiferenciables por medio de IFI, mientras que las infecciones por *Toxoplasma* y *Besnoitia* sp. no interfieren el diagnóstico con *Sarcocystis*, aunque entre *Besnoitia* y *Sarcocystis* pueden existir respuestas comunes a títulos bajos.

RESUMEN

Se investigaron, por medio de IFI, 366 sueros ovinos, de animales con distintas edades y grados de parasitación por sarcosporidios, frente a antígeno que se elaboró a partir de macroquistes de sarcosporidios ovinos. Esta prueba serológica proporcionó un grado de eficacia elevado en la demostración de la parasitación, sobre todo a partir del título 1/40, que representó el 94,8 %.

Se discuten los casos en los que no existió concordancia, entre los títulos de IFI y la parasitación, y se exponen las posibles interpretaciones a este hecho.

SUMMARY

366 ovine sera, from animals of several ages and level of infection by sarcosporidia, were studied by means of the indirect fluorescence antibody

technique (IFAT). The antigen used was prepared from zoites isolated from macrocysts of ovine esophagus. This serological test gave a high accuracy (94.8 %) especially with titles higher than 1/40.

Cases without correlation between titles of IFAT and parasitism are discussed and their possible explanations shown.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AMBROISE-THOMAS, P. (1969).-*Etude sero-inmunologique de dix parasites par les techniques d'immuno-fluorescence* Thèse de Doctorat. Univ. de Lyon.
- 2) ARCA DE PERAZA, L. (1966).-*Sarcocystis tenella*, «spores» in agglutination test sheep. *Tr. Roy. trop. Med. Hyg.*, **60**: 761-765.
- 3) ARYEETEY, E. M. and PIEKARSKI, G. (1976).-Serologische *Sarcocystis* Studien an Menschen und Ratten. *Z. Parasitenk.*, **50**: 109-124.
- 4) AWAD, F. I. (1954).-A new dye test for *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections by use of *Sarcocystis tenella* spores. *Tr. Roy. trop. Med. Hyg.*, **48**: 337-341.
- 5) BENEX, J. (1974).-*Diagnostic immunologique des parasites à protozoaires et heminthes*. Maloine Ed. París.
- 6) BORDJOCHKI, A., CONITCH, V., BUDIMIR, M. and SAVIN, Z. (1975).-Serological investigations of sarcosporidiosis in human beings by the complement fixation test. *2nd European Multicol. Parasitol.*, Trogir, 1-6 sep., p. 17.
- 7) —; —; GADJANSKI, V., PETROVICH, Z. and SABIN, Z. (1972).-Preparation of antigen of *S. tenella* for the indirect fluorescence antibody technique. *Acta Parasitol. Jugoslavica*, **3**: 129-135.
- 8) —; —; PETROVICH, Z. et SAVIN, Z. (1972).-Diagnostic de la sarcosporidiose par l'immuno-fluorescence indirecte. *Rec. Méd. Vét. d'Alfort*, **148**: 217-224.
- 9) —; —; —; — (1971).-La technique de l'immuno-fluorescence pour le diagnostic de la sarcosporidiose. *I. Multicol. European de Parasitologie*. Rennes. Septiembre, 1971, 285-288.
- 10) —; —; —; — (1974).-La relation antigenique entre les espores et la paroi interne de kyste de *S. tenella*. *Third Int. Cong. Parasit.*, München, 2 Sect. D-4, 13.
- 11) —; — (1973).-Recent investigations of sarcosporidiosis in human beings. *Acta Parasitol. Jugoslavica*, **4**: 99-106.
- 12) DOBY, J. M. et BEAUCOURNU, J. A. (1972).-Absence de réactions croisées en immunofluorescence indirecte entre serum de porteurs de *Isospora hominis* et antigènes *Toxoplasma*. *Bull. Soc. Path. exot.*, **3**: 404-409.
- 13) FAYER, R. and LUNDE, M. N. (1977).-Changes in serum and plasma proteins and IgG and IgM antibodies in calves experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. *J. Parasitol.*, **63**: 438-443.
- 14) FULTON, J. D. and TURK, J. L. (1959).-Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, **2**: 1068-1069.
- 15) — and VOLLER, A. (1964).-Evaluation of immunofluorescence and direct agglutination method for detection of specific *Toxoplasma* antibodies. *Brit. med. J.*, **2**: 1173-1175.
- 16) GÓMEZ GARCIA, V. y RODRÍGUEZ OSORIO, M. (1977).-La sarcosporidiosis del ganado caprino de la provincia de Granada. Estudio comparativo del método de digestión pépsica, test de Ouchterlony e immunofluorescencia indirecta. *I. Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos españoles*. Madrid. Octubre, 1977, p. 29.
- 17) HARTLEY, W. J. (1976).-Sporozoa in animals with particular reference to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. *N. Z. Vet. J.*, **24**: 1-5.
- 18) LAARMAN, J. J., TADROS, W. and EIJK, A. (1975).-*Isospora hominis*: the application of the indirect immunofluorescence technique (IFAT) to understanding of the epidemiology of human infection. *Trop. geogr. Med.*, **27**: 226.
- 19) MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R., SELA, M. C. y PEREIRA, A. (1975).-Some facts relating to the diagnosis and biology of *Sarcocystis* spp. *2nd European Multicol. Parasitol.*, Trogir. Septiembre, 1975, pp. 15-16.
- 20) MUHLFORT, H. (1951).-Das Verhalten Sarkosporidien-infizierter Tiere im Sero-Farbtest auf Toxoplasmose nach Sabin-Feldman. *Z. Tropenmed. Parasit.*, **3**: 205-215.
- 21) MUNDAY, B. L. and CORBOULD, A. (1974).-The possible rôle of the dog in the epidemiology of ovine sarcosporidiosis. *Brit. vet. J.*, **130**: ix-xi.
- 22) PANIAGUA ANDRÉS, M. C. (1977).-Aspectos epizootiológicos del aborto ovino en la provincia de León, con especial atención al aborto por *Toxoplasma gondii*. Publicaciones Científicas Ovejero (Tesis Doctoral).
- 23) PEREIRA-LORENZO, A. y SELA, M. C. (1976).-Relación IFI-intensidad del parasitismo en *Sarcocystis*. *I. Congreso Nacional de Parasitología*. Granada. Septiembre, 1976, p. 33.
- 24) —; — y BARRIO, A. (1977).-Inmunidad cruzada de *S. muris*, *S. tenella* y *T. gondii*, en infecciones naturales de cerdos con *Sarcocystis* spp. *I. Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos españoles*. Madrid. Octubre, 1977, p. 32.
- 25) PIEKARSKI, G., SHÄFER, E. und NIEDERLANDER, R. (1961).-Mikroskopische und Serologische Studien über die Häufigkeit von *S. tenella* bei Schafen. *Z. Parasitenk.*, **20**: 579-588.
- 26) REY CALERO, J. y MIRA GUTIÉRREZ, J. A. (1966).-Estudio de las fracciones de los anticuerpos (γ M, γ A, γ G) responsables de las pruebas serológicas en la toxoplasmosis: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación y dye test. *Rev. Ibér. Parasitol.*, **26**: 391.
- 27) ROMMEL, M. und HEYDORN, A. O. (1972).-Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. III. *Isospora hominis* (RAILLIET und LUCET, 1891) WENYON, 1923, eine Dauerform der Sarkosporidien des Rindes und des Schweins. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, **85**: 143-145.
- 28) RUIZ, A. and FRENKEL, J. K. (1976).-Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats. *J. Infect. Dis.*, **133**: 409-418.
- 29) TADROS, W. and LAARMAN, J. J. (1975).-A study of serological crossreaction amongst the four members of the «Toxoplasmea» by the indirect immunofluorescence (IFA) technique. *2nd. European Multicol. Parasit.*, Trogir. Septiembre, 1975, pp. 9-10.
- 30) —; — and EIJK, A. (1973).-The demonstration of antibodies to *Sarcocystis fusiformis* antigen in sera of *I. hominis* carriers using indirect fluorescence technique. *Z. Parasitenk.*, **43**: 221-224.
- 31) —; —; — (1975).-The development of circulating antibodies against *Sarcocystis* in cattle and its correlation with age. *Trop. geogr. Med.*, **27**: 226-227.