

Estudio Poblacional de Prevalencia de Cisticercosis Porcina en Atahualpa, Ecuador. Metodología y Definiciones Operacionales.

Population-Based Study Of Porcine Cysticercosis Prevalence In Atahualpa, Ecuador. Methodology And Operational Definitions.

Oscar H. Del Brutto, MD¹; Gianfranco Arroyo, DVM, MSc²; Armando E. González, DMV, PhD³; Mauricio Zambrano, BS⁴; and Héctor H. García, MD, PhD⁵

Resumen

Objetivo: Evaluar la prevalencia de cisticercosis porcina en la parroquia rural Atahualpa, un poblado donde se ha demostrado endemia de neurocisticercosis humana.

Diseño: Para el presente estudio, se colectarán muestras de sangre de aproximadamente 600 cerdos, las cuales serán procesadas mediante la prueba de EITB para estimar la tasa actual de sero-prevalencia de cisticercosis porcina. Únicamente se considerará el muestreo en cerdos a partir de los 2 meses de edad. Asimismo, solo se considerarán a aquellos animales sin evidencia de manifestaciones clínicas que hagan riesgosa su manipulación durante la toma de muestras de sangre. El presente estudio no contempla riesgo para la salud de los animales durante la toma de muestras. De acuerdo a las características de endemidad de cisticercosis humana en Atahualpa, consideramos que la seroprevalencia esperada de cisticercosis porcina mediante EITB sea de al menos 25%. Entre los objetivos secundarios está el determinar los factores relacionados a una mayor o menor seroprevalencia de cisticercosis porcina (de la esperada). Todos los cerdos que resulten positivos (al menos 3 bandas) en el EITB, serán subsecuentemente tratados con oxfendazole, utilizando el régimen de dosis única de 30 mg/kg.

Comentario: La importancia de definir la presencia de infección en la población porcina de una zona hiper-endémica de neurocisticercosis humana radica en confirmar la existencia de transmisión activa. Si ésta es demostrada, el tratamiento de los cerdos infectados ayudará a interrumpir el ciclo de la *Taenia solium* y reducirá la prevalencia de esta enfermedad..

Palabras clave: Cisticercosis, neurocisticercosis, cisticercosis porcina, Western Blot, Inmunoblot, Estudio Poblacional, Atahualpa.

Abstract

Objective: To assess sero-prevalence of porcine cysticercosis in Atahualpa, a rural Ecuadorian village endemic for human neurocysticercosis.

Design: We aim to collect at least 600 blood samples of local pigs, to quantify the number of positive bands in the EITB, and to estimate crude prevalence rates of porcine cysticercosis in the village. Sampling will only include pigs older than 2 months of age. Only healthy pigs will be sampled, to avoid risks inherent to manipulation of sick animals. There will be no risk for pigs as the result of the procedure. According to the estimated endemicity of human cysticercosis, we expect to find about 25% of infected pigs in this study. In the event of prevalence rates above or below the expected percentage, we will attempt to assess the causes of such discrepancies. All pig positive to 3 bands of more in the EITB will receive treatment with oxfendazole at a single dose of 30 mg/kg.

Comment: The importance of defining the prevalence of porcine cysticercosis in a village endemic for human neurocysticercosis is to confirm the existence of active transmission. If this is true, treatment of infected pigs will help to interrupt the life cycle of *Taenia solium*, thus reducing the prevalence of this disease in humans..

Keywords: Cysticercosis, Neurocysticercosis, Porcine cysticercosis, Western Blot, Immunoblot, Population-based study, Atahualpa.

Rev. Ecuat. Neurol. Vol. 26, N° 1, 2017

¹Escuela de Medicina, Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador

²Escuela de Salud Pública, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Mayor de San Marcos de Lima

⁴Centro de Apoyo Comunitario, Proyecto Atahualpa, Atahualpa, Ecuador

⁵Departamento de Microbiología & Centro de Salud Global - Tumbes, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Correspondencia:

Oscar H. Del Brutto, MD.

Air Center 3542, PO Box 522970, Miami, FL 33152-2970.

Email: oscarandelbrutto@hotmail.com

Introducción

La teniasis/cisticercosis ocasionada por el platelminto *Taenia solium* es prevalente en diferentes áreas rurales de países en vías de desarrollo, así como en ciertas regiones de países desarrollados, con elevadas tasas de migración de gente proveniente de zonas endémicas.¹⁻⁵ El ciclo biológico normal de la *T. solium* incluye al ser humano como hospedero definitivo, albergando al parásito adulto o tenia, y al cerdo como portador intermediario de la fase larvaria o cisticerco.⁶ Bajo determinadas circunstancias, los humanos pueden también convertirse en hospederos intermedios, desarrollando cisticercosis. Los humanos desarrollan principalmente neurocisticercosis (infección del sistema nervioso central por la larva o cisticerco) luego de la ingestión accidental de huevos de *T. solium* en alimentos contaminados por un portador teniásico humano; es decir, la cisticercosis es una enfermedad usualmente transmitida de hombre-a-hombre.⁷ Por otro lado, los cerdos desarrollan cisticercosis principalmente luego de la ingestión directa (debido a sus hábitos coprofágicos en condiciones rurales) de huevos contenidos en las heces de un portador teniásico (Figura 1). La defecación al aire libre o en letrinas no selladas y la libre deambulación

de los cerdos cerca o dentro de las casas, son fundamentales para la transmisión de la enfermedad.

La cisticercosis humana ocasiona un gran impacto en la salud pública, principalmente debido a la cronicidad de la enfermedad, al cuadro clínico que ocasiona, al alto costo asociado al tratamiento de los pacientes afectados y a la pérdida de horas laborales.^{8,9} Por otra parte, la cisticercosis porcina ocasiona pérdidas económicas a los campesinos debido al decomiso de las carcasas infectadas con cisticercos. Además, los cerdos infectados constituyen un reservorio de cisticercos, los cuales al ser consumidos por el hombre, permiten la continuidad del ciclo biológico de *T. solium*.¹⁰

El monitoreo de poblaciones porcinas en áreas rurales endémicas a *T. solium* constituye una herramienta epidemiológica de gran ayuda para evaluar la presencia del parásito en el medio ambiente.¹¹ Por lo general, en estas comunidades los cerdos son criados libremente, por lo que pueden ingerir excretas de un humano teniásico y de esa forma desarrollar cisticercosis. Adicionalmente, el uso de la Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) o Western Blot, como la prueba de referencia para el diagnóstico serológico de cisticer-

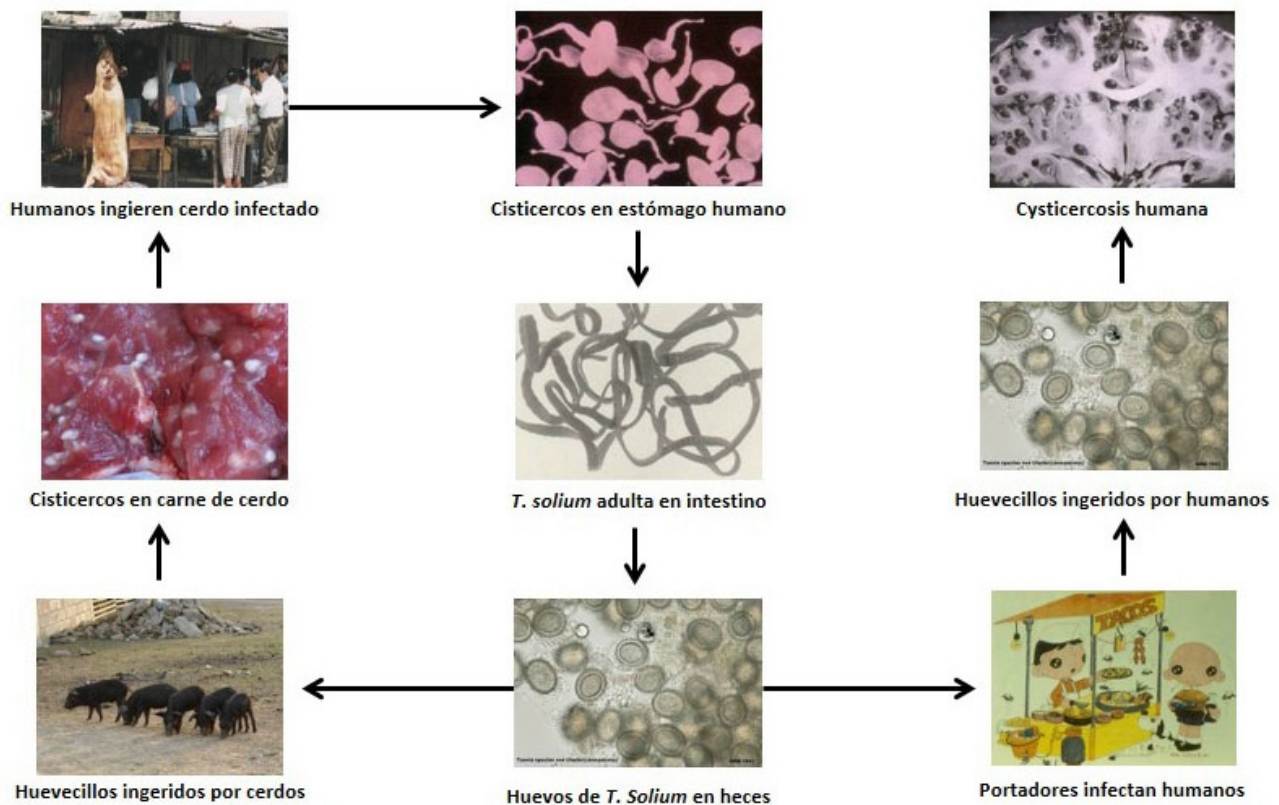


Figura 1. Ciclo biológico de la *Taenia solium*, enfatizándose en su ciclo normal (centro e izquierda) y la transmisión aberrante (derecha) que conlleva a la cisticercosis humana.

cosis, permite la evaluación de anticuerpos específicos contra siete bandas de glicoproteínas del cisticerco, lo que brinda gran información sobre la exposición y el estatus de infección de los cerdos en zonas endémicas a *T. solium*.¹² Estos procedimientos son fundamentales para la instauración de medidas preventivas que ayuden al control de la diseminación de la enfermedad.

Diferentes estudios epidemiológicos sobre cisticercosis humana y epilepsia han sido realizados en la comunidad de Atahualpa, dada la importancia de esta enfermedad y su impacto en la salud pública.¹³⁻¹⁵ Dichos estudios se han basado en evaluación serológica y estudios de imágenes en población general y en personas con epilepsia. No obstante, no se han realizado estudios en la población porcina de dicha comunidad. El estudio de la prevalencia de cisticercosis porcina en la zona y los factores relacionados a su presencia, pueden ayudar a comprender la epidemiología de la neurocisticercosis y epilepsia en Atahualpa. Por esta razones, y utilizando el apoyo logístico del Proyecto Atahualpa, el presente estudio tiene por finalidad realizar un muestreo serológico de la población porcina en la comunidad para la determinación de la prevalencia serológica de cisticercosis.

Población Estudiada

Estudios preliminares realizados por personal de campo del Proyecto Atahualpa revelan la existencia de aproximadamente 900 cerdos en el pueblo. Aunque un buen porcentaje de ellos se encuentran encorralados, muchos cerdos deambulan libremente por calles y casas, en contacto cercano con los habitantes del pueblo (Figura 2). Los cerdos son por lo general comercializados por sus propietarios durante las celebraciones anuales en la comunidad. A la fecha no se ha realizado ninguna campaña sanitaria de desparasitación en la población porcina de Atahualpa.



Figura 2. Imágenes de la población de Atahualpa, mostrando la presencia de cerdos deambulando libremente por las calles, en los patios de las casas y en contacto cercano con los habitantes del pueblo.

Para el presente estudio, el equipo de campo del Centro de Salud Global – Tumbes, UPCH colaborará con el Proyecto Atahualpa en Ecuador, en la colecta de muestras de sangre de aproximadamente 600 cerdos de Atahualpa, las cuales serán procesadas mediante la prueba de EITB para estimar la tasa actual de sero-prevalencia de cisticercosis porcina.

Aspectos Éticos

El presente estudio no contempla riesgo para la salud de los animales durante la toma de muestras. Todos los procedimientos a realizarse en este estudio se seguirán estrictamente de acuerdo con las recomendaciones realizadas por el “Institutional Animal Care and Use Committee” (IACUC) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Este protocolo se registrará en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), y será evaluado por el Comité de Ética previamente mencionado.

Objetivos

De acuerdo a las características de endemidad de cisticercosis humana en Atahualpa, consideramos que la seroprevalencia esperada de cisticercosis porcina mediante EITB en el área de estudio sea de al menos 25%. Entre los objetivos secundarios está el determinar los factores relacionados a una mayor o menor seroprevalencia de cisticercosis porcina (de la esperada) en Atahualpa.

Metodología

Diseño del estudio: Este es un estudio de corte transversal, que considerará el muestreo de cerdos de la comunidad de Atahualpa Ecuador para estimar la seroprevalencia de cisticercosis porcina mediante EITB y los factores relacionados a dicha prevalencia.

Diseño muestral: El cálculo de tamaño muestral mínimo para el estudio es obtenido a partir de la estimación de una proporción esperada de 25% de cisticercosis porcina en poblaciones infinitas, determinado por la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(z_{\alpha/2})^2 \bar{p}(1 - \bar{p})}{E^2}$$

Dónde: $Z_{\alpha/2}$: Valor de Z para un nivel de confianza de 95% (1.96); P: proporción esperada a detectar (25%), y E: error máximo permisible para el IC (5%). A partir del cual definimos un mínimo de 288 porcinos más un 10%

por pérdidas nos da un tamaño muestral de 320 porcinos a evaluar en el área de estudio.

Criterios de inclusión y exclusión: Para propósitos de nuestro estudio únicamente se considerará el muestro en cerdos a partir de los 2 meses de edad. Asimismo, solo se considerarán a aquellos animales clínicamente sanos y sin evidencia de manifestaciones clínicas que hagan riesgosa su manipulación durante la toma de muestras de sangre.

Tipo de muestreo: El muestro a realizarse en el área de estudio se realizará en la medida de lo posible de tipo probabilístico, tratando de cubrir todo el área de estudio con la finalidad de tener un marco muestral representativo. El muestro se realizará puerta por puerta, en el cual el equipo de muestreo se presentará al jefe de casa e indicará los objetivos de la toma de muestras de sangre de los cerdos para el estudio de cisticercosis porcina.

Procedimientos de muestreo: Una vez obtenido el permiso para la toma de muestras biológicas, el equipo de muestreo inmovilizará a los cerdos y se realizará la toma de muestras de sangre mediante punción de la vena cava anterior con sistema de sangrado al vacío (Vacutainer). Se colectarán aproximadamente 5 mL de sangre de cerdo en tubos sin anticoagulante, los cuales serán mantenidos en cadena de frío (4°C) hasta su posterior procesamiento. Luego de la toma de muestras de los cerdos en el hogar, se realizará una pequeña encuesta al propietario con información socio-demográfica general para propósitos del estudio. Todos los cerdos muestreados serán debidamente identificados con un arete numerado.

Procesamiento de muestras de sangre: Las muestras de sangre serán procesadas mediante centrifugación a 3000 RPM para la obtención de alícuotas de suero de 1.5 mL, las cuales serán transportadas a -20°C a la Unidad de Cisticercosis del Instituto de Ciencias Neurológicas de Lima, para el procesamiento mediante EITB. Cada muestra recibirá un código de identificación referente al arete del animal.

Ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB): Se realizará el ensayo de EITB de acuerdo al protocolo descrito por Tsang y colaboradores.¹⁶ Brevemente, el EITB permite la detección de bandas diagnósticas correspondientes a la reacción de anticuerpos específicos contra siete glicoproteínas obtenidas de cisticercos de *T. solium* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con sodio-duodecil sulfato (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubación con los sueros problema. Los resultados de lectura del EITB corresponden al número de bandas diagnósticas contra las

siguientes glicoproteínas GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13. Para propósitos de nuestro estudio, se considerarán positivos a los cerdos si reaccionan al menos a una de las siete bandas del EITB.

Procesamiento de Resultados

Organización de la información: Los resultados de EITB de los cerdos muestreados en el presente estudio (número de bandas positivas, así como los resultados de cada una de las bandas de EITB) serán organizados conjuntamente con los datos de edad, sexo, procedencia de los cerdos y de las demás variables sociodemográficas obtenidas de los propietarios. Esta información será almacenada como base de datos en Excel para análisis posteriores.

Variable desenlace: La variable desenlace de nuestro estudio corresponde a los resultados del ensayo de EITB,¹² a partir del cual se determinará la prevalencia de anticuerpos contra cisticercos (al menos reacción a una de las bandas de EITB). Adicionalmente se brindarán los resultados del número de bandas de EITB y los resultados de presencia o ausencia de cada una de las bandas de anticuerpos.

Definición conceptual: Como resultado dicotómico indicará, un resultado de positividad a al menos una de las bandas de glicoproteínas del EITB contra cisticercosis porcina (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13). Como resultado numérico indicará el número de bandas positivas en el EITB contra cisticercosis porcina.

Definición operativa: La variable dicotómica (positivo o negativo) es definida como 0 (ausencia) o 1 (presencia de alguna de las bandas de EITB). Como variable numérica, este podrá obtener valores de 0 (ausencia de bandas) a 7 (presencia de todas las bandas de EITB).

Otras covariables relevantes: Estas incluirán datos de edad de cerdos (meses), sexo, procedencia así como datos sociodemográficos de los propietarios de cerdos (edad, sexo, estatus socioeconómico, presencia de letrina en el hogar, tipo de crianza de cerdos, etc.), los cuales serán manejados como datos numéricos o categóricos según se requiera.

Procesamiento y análisis estadístico: Se realizará el cálculo de la seroprevalencia de cisticercosis porcina en Atahualpa mediante la siguiente fórmula: $P = (\text{Total cerdos EITB positivos} / \text{Total cerdos muestreados}) \times 100$. Los resultados de seroprevalencia serán presentados con intervalos de confianza del 95%. La evaluación de los factores de riesgo para cisticercosis porcina (definido como resultado dicotómico o presencia/ausencia) será analizado mediante estimación de razones de prevalencia

(RP), utilizando para ello modelos lineales generalizados, familia binomial, función de enlace log y errores estándar robustos para el ajuste dado por muestras correlacionadas de cerdos de un mismo propietario. Se seleccionarán las variables que ingresen al modelo de regresión según criterios de información de Akaike y de Bayes. Asimismo, se evaluará el efecto potencial de colinearidad de algunas covariables en el modelo. Los estimados de RP serán interpretados con sus respectivos intervalos de confianza de 95%. Todos los análisis serán realizados en el paquete estadístico STATA IC 14 (Stata Corp., TX, US).

Tratamiento de cerdos infectados: Todos los cerdos que resulten positivos (al menos 3 bandas) en el EITB, serán subsecuentemente tratados con oxfendazole, utilizando el régimen de dosis única de 30 mg/kg.^{17,18} De esta manera, se espera reducir de manera significativa la presencia de infección porcina activa en esta población, en el caso que existiera.

Limitaciones

La principal limitación de nuestro estudio podría ser la no disponibilidad de porcinos durante el estudio, lo cual significaría que sus dueños se rehúsen a dejar que sus cerdos sean muestreados. No obstante, la comunidad de Atahualpa se encuentra al tanto de las actividades que se vienen realizando para el control de la neurocisticercosis, por lo que se espera su participación en el estudio. Otras posibles limitaciones logísticas serán apoyadas por el trabajo conjunto del personal del Centro de Salud Global-Tumbes de la UPCH y el equipo de trabajo del Proyecto Atahualpa en Ecuador.

Comentario

La importancia de definir la presencia de infección en la población porcina de una zona hiper-endémica radica en confirmar la existencia de transmisión activa. De acuerdo con el conocimiento tradicional, si existe transmisión activa en una población, deberían de esperarse casos de distinta fecha de infección, es decir, observar lesiones cisticercóticas cerebrales en diversos estadios evolutivos, algunas calcificadas (como reflejo de infecciones remotas) y otras lesiones viables (como manifestación de infecciones recientes), además de esperar un aumento en la prevalencia de neurocisticercosis de acuerdo a la edad, por infecciones acumulativas. En un estudio preliminar, con resultados aún no publicados, pudimos demostrar que la prevalencia de neurocisticercosis en residentes de Atahualpa, prácticamente se mantiene similar a partir de los 25-30 años de edad en adelante, lo cual sugeriría ausencia de transmisión activa (Figura 3). Además, y de manera muy interesante, todas las lesiones que encontramos en 118 sujetos infectados (de un total de 1.228 sujetos mayores de 20 años sometidos a TC cerebro), correspondieron a lesiones calcificadas y no hubo un solo caso con quistes viables (Del Brutto, comunicación personal). Estos datos sugerirían ausencia de transmisión activa, es decir, ausencia de infección porcina. De manera alternativa, sería factible suponer – en caso de encontrar cerdos infectados – que los humanos se contagian en edades tempranas de su vida y luego quedan protegidos de infecciones recurrentes, por mecanismos de resistencia inmune aún no conocidos.

Porcentajes (con 95% C.I.) de pacientes con NCC de acuerdo a edad (todos con lesiones calcificadas, no hubo casos de quistes viables)

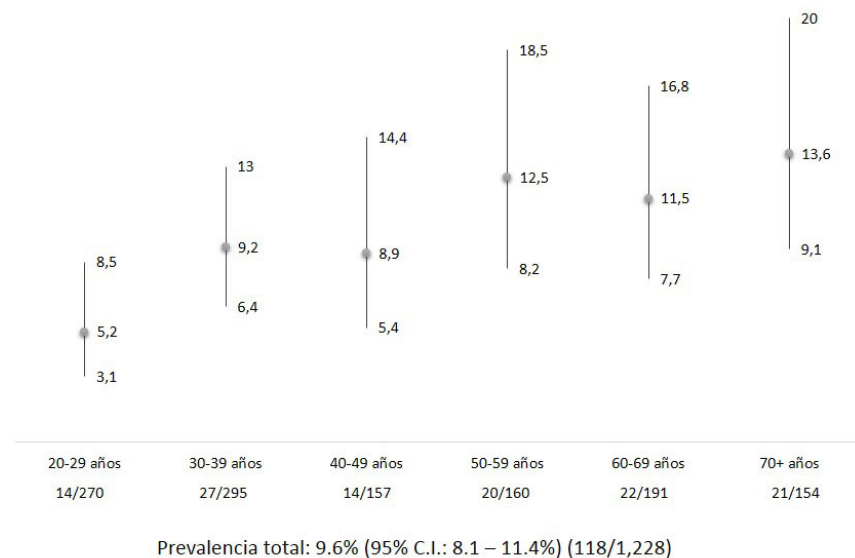


Figura 3. Diagrama que muestra la prevalencia cruda (con 95% C.I.) de la neurocisticercosis humana en Atahualpa, con escasa diferencia de acuerdo a la edad.

Referencias

1. Medina MT, Duron RM, Martinez L. Prevalence, incidence, and etiology of epilepsies in rural Honduras: The Salamá study. *Epilepsia* 2005; 46: 124-131.
2. Montano SM, Villaran MV, Ylquimiche L et al. Neurocysticercosis. Association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. *Neurology* 2005; 65: 229-234.
3. Fleury A, Gomez T, Alvarez I, et al. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 2003; 22: 139-45.
4. Prasad KN, Verma A, Srivastava S, et al. An epidemiological study of asymptomatic neurocysticercosis in a pig farming community in northern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105: 531-6.
5. Del Brutto OH, Garcia HH. Neurocysticercosis in nonendemic countries: time for a reappraisal. *Neuroepidemiology* 2012; 39: 145-146.
6. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol* 2014; 13: 1202-15.
7. Lescano AG, Garcia HH, Gilman RH, et al. *Taenia solium* cysticercosis hotspots surrounding tapeworm carriers: clustering on human seroprevalence but not on seizures. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(1): e371.
8. Bhattarai R, Carabin H, Proaño JV, et al. Cost of neurocysticercosis in patients treated in two referral hospitals in Mexico City, Mexico. *Trop Med Int Health* 2015; 20: 1108-1109.
9. Rajshekhar V, Joshi DD, Doanh NQ, et al. *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Trop Med* 2003; 87: 53-60.
10. O'Neal SE, Moyano LM, Ayvar V, et al. Ring-screening to control endemic transmission of *Taenia solium*. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(9): e3125.
11. García HH, González AE, Tsang VC, et al. Elimination of *Taenia solium* transmission in northern Peru. *N Engl J Med* 2016; 374: 2335-2344.
12. Jayashi CM, González AE, Castillo Neira R, et al. Validity of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for naturally acquired porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 2014; 199: 42-49.
13. Del Brutto, OH, Santibañez R, Idrovo L, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in Atahualpa: a door-to-door survey in rural coastal Ecuador. *Epilepsia* 2005; 46: 583-587.
14. Del Brutto OH, Salgado P, Lama J, et al. Calcified neurocysticercosis associates with hippocampal atrophy: a population-based study. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92: 64-68.
15. Del Brutto OH, Issa NP, Salgado P, et al. The association between neurocysticercosis and hippocampal atrophy is related to age. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96: 243-348.
16. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 1989; 159: 50-59.
17. Moreno L, López-Urbina MT, Fariás C, et al. A high oxfendazole dose to control porcine cysticercosis: pharmacokinetics and tissue residue profiles. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3819-1825.
18. González AE, Falcón N, Garcia HH, et al. Treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole: a dose-response trial. *Vet Rec* 1997; 141: 420-422.