



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Estudio de la variabilidad genética y fenotípica de
especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu
lato en hospedadores intermediarios de la provincia de
Neuquén

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

Autora: Lic. María Florencia Debiaggi

Directora: Prof. Dra. Nora B. Pierangeli

Co-directora: Dra. Silvia Viviana Soriano

Lugar de realización: Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de
Ciencias Médicas. Universidad Nacional del Comahue.

2020

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Nora, mi directora, que sin conocerme me dio un lugar en su grupo de trabajo. Gracias por todo lo que me enseñaste y por tu apoyo incondicional y por permitirme crecer profesionalmente. Además, quiero agradecerte por ese trato especial que siempre me brindaste, muy familiar y afectuoso.

A mi codirectora Vivi, gracias por compartir conmigo toda tu experiencia y conocimiento. Gracias por tu incondicional y permanente ayuda y por los buenos momentos compartidos.

A Lore, mi compañera de laboratorio, por su alegría, gracias por ayudarme en lo experimental y por los buenos momentos compartidos. A Irene, por su ayuda en mis primeros años de CoproAg, por su compañía y largas charlas en nuestras mañanas de laboratorio. A Gaby, por ser tan compañera y por darme una mano siempre que lo necesitaba. A Mai, Seba, Barby y Agustín, que me ayudaron en el laboratorio. A Marcos Gómez, por ayudarme siempre que se lo pedía.

A Luis, por capacitarme en el mundo de la biología molecular, por darme un lugar en el Laboratorio Central y por ayudarme siempre que lo necesitaba. A Meli, Mariano y Coti que me daban una mano cada vez que iba a la subse. A mi querida amiga Euge, por ayudarme en el laboratorio, por sus consejos y por nuestras largas charlas en el laboratorio y en nuestras caminatas.

A los infectólogos y cirujanos del Hospital Castro Rendón y clínicas privadas, por su colaboración para la obtención de quistes hidatídicos de humanos y los datos clínicos de esos pacientes, sin los que no hubiera sido posible este trabajo. A Héctor Bergagna, por su colaboración para la obtención de quistes hidatídicos de ganado.

También agradecer al Dr. Juan Basualdo por confiar en mí y ser mi director de CONICET.

A Cristian Alvarez Rojas, por invitarme a realizar una pasantía en el instituto de parasitología de la Universidad de Zúrich, por compartir todo tu conocimiento y experiencia y por la buena onda. Al Dr. Peter Deplazes, por darme un lugar en su grupo de trabajo durante un mes y así poder realizar mi pasantía. A Christian Hidalgo, gracias por ayudarme en el laboratorio y por las charlas en el almuerzo y durante la espera de los termocicladores. A Sophie, por darme un lugar en su casa y hacer muy agradable mi estadía en Suiza.

A mis amigos de siempre y mi familia, por apoyarme a lo largo de este trayecto.

A Juli, mi hermana, por su apoyo incondicional.

A mi mamá y mi papá, que siempre me apoyaron en todas las decisiones, por sus consejos y por ayudarme siempre con lo que necesitaba.

A Esteban, por su amor, por su apoyo incondicional durante mi carrera, sobretodo en los últimos dos años, y por apoyarme siempre en todas mis decisiones.

A todos, muchísimas gracias!!!

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
ABREVIACIONES	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El parásito	2
1.2. Morfología y ciclo biológico de <i>E. granulosus</i> sensu lato	3
1.2.1. Morfología del estadio adulto	3
1.2.2. Morfología del huevo	4
1.2.3. Morfología del metacestodo	5
1.2.4. Ciclo biológico de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	8
1.3. Especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	10
1.3.1. Microdiversidad de los genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	12
1.4. Patrones del ciclo de vida de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	14
1.4.1. <i>E. granulosus</i> sensu stricto.....	15
1.4.2. <i>E. equinus</i>	16
1.4.3. <i>E. ortleppi</i>	16
1.4.4. <i>E. canadensis</i>	17
1.4.5. <i>E. felidis</i>	18
1.5. Distribución global de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	18
1.5.1. Epidemiología molecular en Europa.....	19
1.5.2. Epidemiología molecular en Asia.....	21
1.5.3. Epidemiología molecular en Oceanía.....	22
1.5.4. Epidemiología molecular en África.....	22
1.5.5. Epidemiología molecular en América.....	23
1.6. Echinococcosis quística en Argentina.....	26
1.7. Impacto socio-económico de la echinococcosis quística.....	29
1.8. Echinococcosis quística en humanos.....	30
1.8.1. Patología y clínica.....	30

	Páginas
1.8.2. Aspectos inmunológicos de la infección por <i>E. granulosus</i> sensu lato en humanos.....	34
1.8.3. Diagnóstico y seguimiento de la Echinococcosis quística.....	39
1.8.3.1. Técnicas de imagen.....	39
1.8.3.2. Técnicas inmunodiagnósticas.....	40
1.8.3.3. Técnicas de detección histológica del parásito.....	43
1.8.4. Tratamiento.....	43
1.8.4.1. Cirugía.....	44
1.8.4.2. Drenaje percutáneo.....	45
1.8.4.3. Tratamiento farmacológico con benzimidazoles.....	45
1.8.4.4. “ <i>Watch and wait</i> ” (observar y esperar).....	47
1.9. Situación de la Echinococcosis quística en Neuquén.....	47
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	52
2.1. Objetivo general.....	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
2.3. Hipótesis de trabajo.....	54
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
3.1. Estudio 1: Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de la provincia de Neuquén.....	57
3.1.1. Área y período de estudio.....	57
3.1.2. Diseño del estudio.....	58
3.1.3. Obtención y caracterización biológica del material parasitario.....	58
3.1.4. Procesamiento de los quistes hidatídicos.....	59
3.1.4.1. Separación de los elementos del quiste y recuento de protoescolices.....	59
3.1.5. Determinación de las especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	59
3.1.5.1. Procesamiento del material parasitario.....	59
3.1.5.2. Extracción de ADN.....	60
3.1.5.3. Amplificación de ADN.....	61
3.1.5.4. Secuenciación.....	61

	Páginas
3.1.5.5. Análisis e interpretación de las secuencias.....	61
3.1.6. Evaluación de la fertilidad de quistes hidatídicos.....	62
3.1.7. Evaluación de la viabilidad de quistes hidatídicos.....	63
3.1.8. Análisis estadístico de los datos.....	63
3.2. Estudio 2: Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén.....	64
3.2.1. Área y período del estudio.....	64
3.2.2. Diseño del estudio.....	64
3.2.3. Obtención y caracterización del material parasitario.....	64
3.2.3.1. Características moleculares y biológicas del quiste.....	65
3.2.3.2. Características clínicas del paciente.....	65
3.2.3.3. Aspectos éticos.....	65
3.2.4. Determinación de haplotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato en humanos.....	66
3.2.4.1. Amplificación del gen completo <i>cox1</i>	66
3.2.4.2. Secuenciación.....	67
3.2.4.3. Construcción de redes de haplotipos.....	68
3.2.5. Descripción de los ciclos de transmisión de <i>E. granulosus</i> sensu lato en ganado y humanos.....	68
3.2.6. Análisis estadístico de los datos.....	68
3.3. Estudio 3: Aspectos inmunológicos de la infección por <i>E. granulosus</i> sensu lato en humanos.....	70
3.3.1. Evaluación de la sensibilidad de diferentes métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgG anti <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	70
3.3.2. Evaluación de la respuesta inmune de pacientes con hidatidosis en función de distintas variables.....	72
3.3.3. Obtención y procesamiento del líquido hidatídico.....	72
3.3.3.1. Caracterización y fraccionamiento del LH.....	72
3.3.3.2. Concentración y conservación del LH.....	72
3.3.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	72
3.3.5. Caracterización antigénica del líquido hidatídico.....	73
3.3.5.1. Transferencia de los geles.....	73
3.3.5.2. Inmunoblotting.....	74

	Páginas
3.3.6. Análisis estadístico de los datos.....	74
4. RESULTADOS.....	75
4.1. Estudio 1: Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de la provincia de Neuquén.....	76
4.1.1. Caracterización de las especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de los quistes de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de Neuquén.....	77
4.1.2. Distribución espacial de las especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de los quistes de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de Neuquén.....	78
4.1.3. Evaluación de la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato en quistes de ganado de la provincia de Neuquén, utilizando la secuencia parcial del gen <i>cox1</i>	79
4.1.4. Evaluación de la localización anatómica de los quistes hidatídicos.....	83
4.1.5. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes.....	83
4.1.6. Evaluación de la relación entre el genotipo, la localización anatómica y fertilidad del QH.....	84
4.2. Estudio 2: Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén.....	87
4.2.1. Caracterización de las especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de los quistes hidatídicos humanos.....	89
4.2.1.1. Distribución espacial de las especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de pacientes con quistes hidatídicos de Neuquén.....	90
4.2.2. Evaluación de la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato en quistes humanos de la provincia de Neuquén, utilizando la secuencia completa del gen <i>cox1</i>	93
4.2.2.1. Variabilidad genética de <i>E. granulosus</i> sensu stricto en la provincia de Neuquén.....	93
4.2.2.2. Red de haplotipos, Índices de diversidad y neutralidad de <i>E. granulosus</i> sensu stricto.....	96
4.2.2.3. Haplotipos de <i>E. canadensis</i> en la provincia de Neuquén.....	98
4.2.2.4. Red de haplotipos, índices de diversidad y neutralidad de <i>E. canadensis</i>	99
4.2.3. Descripción de los ciclos de transmisión de <i>E. granulosus</i> sensu lato en ganado y humanos de la provincia de Neuquén.....	102

	Páginas
4.2.4. Características clínicas de los pacientes: distribución de casos por edad y sexo...	103
4.2.4.1. Relación entre genotipo y las características clínicas del paciente.....	105
4.2.5. Evaluación de la localización anatómica de los quistes hidatídicos humanos.....	106
4.2.5.1. Relación entre genotipo y localización anatómica de los quistes hidatídicos.....	107
4.2.6. Evaluación del número de quistes hidatídicos por paciente.....	108
4.2.6.1. Relación entre genotipo y número de quistes hidatídicos.....	108
4.2.7. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes hidatídicos.....	109
4.2.7.1. Relación entre genotipo y fertilidad de quistes hidatídicos.....	110
4.2.7.2. Tratamiento farmacológico de los pacientes.....	110
4.2.8. Evaluación del tamaño y crecimiento de los quistes hidatídicos.....	111
4.2.8.1. Relación entre genotipo, tamaño del quiste y edad del paciente.....	113
4.2.9. Determinación del estadio de los quistes hepáticos utilizando el criterio de OMS.....	116
4.2.9.1. Relación entre genotipo y estadio de los quistes hepáticos según OMS.....	116
4.2.10. Sintomatología de los pacientes.....	118
4.2.10.1. Relación entre genotipo y sintomatología del paciente.....	120
Estudio 3: Aspectos inmunológicos de la infección por <i>E. granulosus</i> sensu lato en humanos	121
4.3.1. Comparación de la sensibilidad de diferentes métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgG anti <i>E. granulosus</i> sensu lato en humanos.....	121
4.3.1.1. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al genotipo del QH.....	121
4.3.1.2. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación a la localización anatómica del QH.....	122
4.3.1.3. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al estadio según OMS de QH hepáticos.....	123
4.3.1.4. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al tamaño del QH	123
4.3.1.5. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al número de QH	125
4.3.1.6. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al grupo etario.....	126
4.3.2. Perfil proteico del líquido hidatídico de quistes de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos y humanos.....	126

	Páginas
4.3.3. Caracterización antigénica del líquido hidatídico de quistes de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos y humanos.....	128
4.3.4. Evaluación de la respuesta inmune de pacientes infectados con quistes de diferentes genotipos mediante inmunoblot frente a diferentes perfiles antigénicos de líquido hidatídico.....	134
5. DISCUSIÓN.....	135
5.1. Estudio 1: Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de la provincia de Neuquén.....	136
5.2. Estudio 2: Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén.....	150
5.3. Estudio 3: Aspectos inmunológicos de la infección por <i>E. granulosus</i> sensu lato en humanos.....	180
6. CONCLUSIONES.....	196
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201
8. ARTÍCULO DE RESPALDO.....	229

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	Páginas
Tabla 1. Propuestas de clasificación taxonómica del género <i>Echinococcus</i>	12
Tabla 2. Distribución de especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato identificados en quistes hidatídicos de hospedadores intermediarios de Neuquén.....	78
Tabla 3. Haplotipos del genotipo G1 de <i>E. granulosus</i> sensu stricto encontrados en las secuencias del gen mitocondrial <i>cox1</i> de aislamientos de ganado de Neuquén.....	80
Tabla 4. Números de acceso en GenBank de secuencias parciales del gen mitocondrial <i>cox1</i> identificadas en la provincia de Neuquén.....	82
Tabla 5. Distribución de los quistes hidatídicos según hospedador y localización anatómica.....	83
Tabla 6. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes según el hospedador intermediario.....	84
Tabla 7. Distribución de los genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato en quistes hidatídicos provenientes de hospedadores intermediarios de Neuquén en relación a la fertilidad y la localización anatómica.....	85
Tabla 8. Características predominantes de los quistes hidatídicos provenientes de hospedadores intermediarios de Neuquén.....	86
Tabla 9. Número de casos por 100.000 habitantes de hidatidosis humana por departamento en la provincia de Neuquén durante el período 2013-2018.....	88
Tabla 10. Haplotipos del genotipo G1 de <i>E. granulosus</i> sensu stricto encontradas en las secuencias del gen mitocondrial <i>cox1</i> de aislamientos de humanos de Neuquén.....	89
Tabla 11. Números de acceso en GenBank de secuencias parciales del gen de <i>cox1</i> mitocondrial identificadas en humanos de la provincia de Neuquén.....	90
Tabla 12. Distribución espacial por localidad de las especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato identificados en quistes hidatídicos de humanos de Neuquén....	92
Tabla 13. Sustitución de nucleótidos encontrados en las secuencias del gen <i>cox1</i> (1609 pb) en nueve haplotipos descriptos de 26 aislamientos de <i>E. granulosus</i> sensu stricto en pacientes de Neuquén.....	95
Tabla 14. Sustitución de nucleótidos encontrados en las secuencias del gen <i>cox1</i> (1608 pb) en nueve haplotipos descriptos de 19 aislamientos de <i>E. canadensis</i> en Neuquén.....	99
Tabla 15. Distribución por edad y sexo de pacientes con hidatidosis de Neuquén.....	104
Tabla 16. Distribución del sexo y grupo etario de los paciente en función del genotipo de el/los quistes.....	105

	Páginas
Tabla 17. Frecuencia de localización anatómica de quistes hidatídicos por paciente de Neuquén.....	106
Tabla 18. Distribución de genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de acuerdo a la localización anatómica de QH en humanos.....	107
Tabla 19. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes según la localización anatómica del quiste hidatídico.....	109
Tabla 20. Distribución de los genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de quistes hidatídicos de humanos de Neuquén en relación a la fertilidad y la localización anatómica.....	110
Tabla 21. Viabilidad de acuerdo a la duración del tratamiento farmacológico en pacientes con hidatidosis.....	111
Tabla 22. Medida del diámetro mayor de los quistes en las localizaciones anatómicas más frecuentes.....	112
Tabla 23. Medida del diámetro mayor del quiste en función de la localización y el genotipo.....	114
Tabla 24. Clasificación por OMS de quistes hidatídicos hepáticos de pacientes de Neuquén.....	116
Tabla 25. Distribución de los genotipos de los QH hepáticos según el estadio del quiste (OMS).....	117
Tablas 26. Edad de pacientes y diámetro de quistes de acuerdo al estadio del quiste hidatídico.....	117
Tablas 27. Características clínicas de los pacientes sintomáticos.....	119
Tabla 28. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al genotipo de los quistes hidatídicos presentes en el paciente.....	122
Tabla 29. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo a la localización de el/los quiste/s presentes en los pacientes.....	122
Tabla 30. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al estadio de los quistes hepáticos según OMS.....	123
Tabla 31. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño del QH.....	124
Tabla 32. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño de los QH hepáticos.....	124
Tabla 33. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño de los QH pulmonares.....	125
Tabla 34. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al número de quistes hidatídicos por paciente.....	125

	Páginas
Tabla 35. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al grupo etario de los pacientes.....	126
Tabla 36. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil proteico realizado en SDS-PAGE del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios y genotipos.....	127
Tabla 37. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente a suero de humanos infectados con <i>E. granulosus</i> sensu stricto G1.....	130
Tabla 38. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente a suero de humanos infectados con <i>E. granulosus</i> sensu stricto G3.....	131
Tabla 39. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente a suero de humanos infectados con <i>E. canadensis</i> G6.....	132
Tabla 40. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente al suero de un humano coinfectado con <i>E. granulosus</i> sensu stricto G1 y <i>E. canadensis</i> G7.....	133
 FIGURAS	
Figura 1. Clasificación taxonómica del género <i>Echinococcus</i>	2
Figura 2. <i>E. granulosus</i> sensu lato adulto. A: escólex; B: estróbila; C: proglótide.....	4
Figura 3. Esquema de la estructura del huevo de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	4
Figura 4. Metacestodo.....	6
Figura 5. Protoescólices con corona de ganchos y corpúsculos calcáreos.....	7
Figura 6. Ciclo biológico de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	8
Figura 7. Distribución global actual de <i>E. granulosus</i> sensu lato causante de echinococcosis en los principales hospedadores intermediarios.....	19
Figura 8. Distribución actual de <i>E. granulosus</i> sensu lato en hospedadores intermediarios domésticos (ovinos, bovinos y porcinos) de América del Sur.....	24
Figura 9. Incidencia actual de echinococcosis quística en humanos de América del Sur	25
Figura 10. Mapa de la incidencia de echinococcosis quística humana acumulada en Argentina, en el período 2009 – 2014.....	27

	Páginas
Figura 11. Clasificación de quistes hepáticos según imágenes ecográficas, propuestas por la Organización Mundial de la Salud.....	32
Figura 12. La posible progresión del desarrollo de quistes basado en observaciones a largo plazo.....	33
Figura 13. Asignación de las modalidades de tratamiento a las etapas individuales de los quistes hidatídicos y los riesgos de complicaciones por estadio y tamaño del quiste.....	44
Figura 14. Pastoreo de cabras en el departamento de Minas, Neuquén.....	49
Figura 15. Arreo de animales a la veranada en el departamento Chos Malal, Neuquén.....	49
Figura 16. Ubicación de la Provincia de Neuquén en Argentina.....	58
Figura 17. Procesamiento de los quistes hidatídicos.....	59
Figura 18. Protoescólices viables y no viables.....	63
Figura 19. Localidades de procedencia de quistes hidatídicos analizados en este trabajo de tesis.....	76
Figura 20. Corrida electroforética en gel de agarosa 2% preteñido con Gel Red de los productos de amplificación del fragmento del gen mitocondrial <i>cox1</i>	77
Figura 21. Distribución espacial por departamento de especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato y tipo de HI de aislamientos de Neuquén.....	79
Figura 22. Red de haplotipos de las 26 secuencias parciales del gen <i>cox1</i> para <i>E. granulosus</i> sensu stricto.....	80
Figura 23. Red de haplotipos de las 30 secuencias parciales del gen <i>cox1</i> para <i>E. canadensis</i> G6 y G7.....	81
Figura 24. Árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen mitocondrial <i>cox1</i> de los aislamientos de <i>E. granulosus</i> sensu lato obtenidos en el presente estudio y con las secuencias de los genotipos de referencia de 366 pb.....	82
Figura 25. Localidades de procedencia de quistes hidatídicos de humanos analizados en el trabajo de tesis.....	87
Figura 26. Distribución espacial por localidad de especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato identificados en pacientes de Neuquén.....	91
Figura 27. Distribución de los haplotipos de <i>E. granulosus</i> sensu stricto encontrados en 22 pacientes de diferentes localidades de la provincia de Neuquén.....	94
Figura 28. Red de haplotipos de las 26 secuencias completas del gen <i>cox1</i> para <i>E. granulosus</i> sensu stricto.....	96

	Páginas
Figura 29. Red de haplotipos construida con secuencias completas del gen <i>cox1</i> de <i>E. granulosus</i> sensu stricto encontradas en el presente trabajo de tesis y secuencias descriptas en Chile, Perú y Bolivia.....	97
Figura 30. Distribución de los haplotipos de <i>E. canadensis</i> encontrados en 19 pacientes (n= 19) de diferentes localidades de la provincia de Neuquén.....	98
Figura 31. Red de haplotipos de las 19 secuencias completas del gen <i>cox1</i> para <i>E. canadensis</i> encontradas en la provincia de Neuquén.....	100
Figura 32. Red de haplotipos de los 355 aislamientos que presentaban la secuencia completa del gen <i>cox1</i> para <i>E. canadensis</i> G6 descriptos en la provincia de Neuquén, otras provincias de Argentina, Europa, Asia y África.....	101
Figura 33. Distribución espacial por localidad de especies y genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato de aislamientos de ganado y humanos de Neuquén.....	103
Figura 34. Distribución de pacientes analizados en función del genotipo y el número de QH por paciente.....	108
Figura 35. Variación de las medidas promedio del diámetro mayor de quistes hepáticos y pulmonares en función del grupo etario del paciente.....	113
Figura 36. Variación de las medidas promedio del diámetro mayor de quistes hepáticos G1 y G6 en función del grupo etario del paciente.....	115
Figura 37. Variación de las medidas promedio del diámetro mayor de quistes pulmonares G1 y G6 en función del grupo etario del paciente.....	115
Figura 38. Separación de las fracciones proteicas de líquidos hidatídicos concentrados en SDS-PAGE 12 %.....	128
Figura 39. Caracterización por inmunoblot de antígenos de líquidos hidatídicos de origen caprino, ovino, bovino, porcino y humano con sueros de humanos infectados con distintos genotipos de <i>E. granulosus</i> sensu lato.....	129

RESUMEN

La equinococosis quística (EQ) o hidatidosis es una zoonosis desatendida que afecta principalmente regiones ganaderas, causando importantes problemas de salud y pérdidas económicas. La incidencia anual promedio de EQ en humanos de Argentina en el año 2018 fue de 0,7/100.000 habitantes, mientras que en Neuquén fue 6,18/100.000 habitantes, a pesar que la provincia se encuentra bajo un programa de control de EQ desde hace 50 años.

La EQ es causada por el complejo de especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato, que incluye cuatro especies: *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotipos G1 y G3; *Echinococcus equinus* G4; *Echinococcus ortleppi* G5; y *Echinococcus canadensis* G6, G7, G8 y G10. Los genotipos presentan diferencias en la especificidad del hospedador, distribución geográfica, morfología, biología del desarrollo, infectividad en humanos, antigenicidad, sensibilidad a los fármacos y patogenicidad. Hasta el momento, en Neuquén se han descrito los genotipos G1, G3, G6 y G7 en ganado, así como G1 y G6 en humanos. La diversidad de genotipos en ganado es mayor que la encontrada hasta ahora en humanos de Neuquén, sugiriendo que más genotipos podrían causar hidatidosis humana esta región. Existen escasos reportes que relacionen el genotipo del quiste hidatídico (QH) con las características biológicas de los quistes y aspectos clínicos en humanos.

Teniendo en cuenta lo descrito, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue evaluar la variabilidad genética y fenotípica de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en hospedadores intermediarios (HI) y humanos de la provincia de Neuquén, Argentina.

El presente trabajo de tesis se dividió en tres estudios. En el estudio 1 se realizó la caracterización molecular y biológica de 81 QH de caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de Neuquén. Se demostró la presencia de los genotipos G1, G6 y G7, y que existen diferencias fenotípicas de acuerdo al genotipo entre los quistes de los distintos HI. Se evaluó la microdiversidad genética del gen parcial de *cox1* de *E. granulosus* sensu lato y se encontró relación haplotipo-localización anatómica en el ganado ovino: G1 original-localización hepática; G1nqnB-localización pulmonar.

En el estudio 2 se realizó la caracterización molecular, biológica y clínica de QH humanos de Neuquén. Se genotipificaron 149 QH de 108 pacientes y se demostró la presencia de los genotipos G1, G3, G6 y G7, distribuidos de manera heterogénea en la provincia. Se describió por primera vez en Argentina un humano infectado con G3. Este estudio es el primer reporte en las Américas en describir una infección humana con *E. canadensis* G7 y el segundo reporte a nivel mundial en describir una coinfección con dos especies y genotipos diferentes (G1 y G7) de *E. granulosus* sensu lato en humanos. Se evaluó la microdiversidad genética de los haplotipos del gen completo de *cox1* de *E. granulosus* sensu lato en quistes humanos y se describieron por primera vez tres haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto y cinco haplotipos de *E. canadensis*. Existen ciclos simultáneos y activos de varias especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en Neuquén, todos infectivos para el hombre, siendo el ganado ovino reservorio de G1, el ganado caprino de G6 y el ganado porcino de G7. Se evaluó la relación entre el genotipo de QH humanos y distintas características clínicas del paciente y de los QH. Los resultados más relevantes demostraron que existe asociación entre G1 y localización hepática, y G6 y localización pulmonar.

Además, en QH hepáticos se observó relación entre G1 y estadio activo del QH, y G6 y estadio inactivo del QH.

En el estudio 3 se analizaron los aspectos inmunológicos de la infección por *E. granulosus* sensu lato en humanos. Se evaluó la sensibilidad de tres tests serológicos comerciales: ELISA IgG, test inmunocromatográfico rápido (TIR) y hemoaglutinación indirecta (HAI). TIR y ELISA IgG presentaron mayor sensibilidad que HAI para la detección de anticuerpos contra *E. granulosus* sensu lato en muestras de suero humano. La respuesta inmune de los pacientes se evaluó mediante los tests TIR y ELISA IgG en relación a diferentes variables, y se observó que estaba afectada por el tamaño de los QH, el estadio de los quistes hepáticos y por la cantidad de QH por paciente. Los perfiles proteicos de los líquidos hidatídicos (LH) provenientes de ganado y humanos de Neuquén, presentaron diferencias relacionadas con el tipo de hospedador, genotipo, localización y fertilidad de los QH. Se evaluó la composición antigénica del LH proveniente de QH de distintos HI y humanos enfrentando el perfil proteico del LH con sueros de pacientes con hidatidosis confirmada, teniendo en cuenta el genotipo del QH con el cual estaban infectados estos pacientes. Se observaron diferencias en la composición antigénica del LH de distintos HI y humanos, atribuidas a las diferencias de HI, genotipo y fertilidad del QH y al genotipo del suero del paciente. El antígeno B estaba presente en la mayoría de los LH analizados pero con diferencias en la cantidad de bandas antigénicas, sugiriendo que podría ser utilizado para el inmunodiagnóstico de hidatidosis humana.

Los resultados obtenidos permiten concluir que existe importante variabilidad genética y fenotípica entre las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en los distintos HI y humanos presentes en la provincia de Neuquén. Los conocimientos generados permiten una mejor comprensión de la transmisión de la EQ, la biología del parásito, los genotipos presentes en los distintos HI y humanos y su distribución geográfica, los aspectos clínicos e inmunológicos de la infección. Estos conocimientos resultan de gran utilidad para ser aplicados al diseño de nuevas estrategias en el programa de control de hidatidosis de Neuquén, más adaptados a las características biológicas de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato presentes en Neuquén, con el fin de optimizar el control y la vigilancia de la enfermedad en la provincia. Además, estos conocimientos podrían servir para revisar las indicaciones actuales sobre el diagnóstico y manejo de los pacientes con EQ a nivel provincial. La aplicación de medidas más eficientes contribuirá a disminuir la endemidad de la EQ y por lo tanto mejorar la salud de la población.

ABSTRACT

Cystic echinococcosis (CE) or hydatidosis is a neglected zoonosis that mainly affects livestock regions, causing significant health problems and economic losses. The main annual incidence of CE in humans in Argentina in 2018 was 0.7/100,000 inhabitants, while in Neuquén it was 6.18/100,000 inhabitants, despite the fact that the province has been under a CE control program during the last 50 years.

CE is caused by the *Echinococcus granulosus* sensu lato complex, which includes four species: *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotype G1 and G3; *Echinococcus equinus* G4; *Echinococcus ortleppi* G5; and *Echinococcus canadensis* G6, G7, G8 and G10. Genotypes differ in host specificity, geographic distribution, morphology, developmental biology, infectivity to humans, antigenicity, drug sensitivity, and pathogenicity. Up to the present, genotypes G1, G3, G6 and G7 have been described in livestock, whereas only G1 and G6 in humans from Neuquén. The diversity of genotypes in livestock is greater than that found to date in humans in Neuquén, suggesting that more genotypes could also cause human CE in this region. There are few reports that relate the genotype of the hydatid cyst with the biological characteristics of the cysts and the clinical aspects in humans.

Taking into account what has been described, the general objective of this thesis work was to evaluate the genetic and phenotypic variability of species and genotypes of *E. granulosus* sensu lato in intermediate hosts (IH) and humans from the province of Neuquén, Argentina.

The present thesis work was divided into three studies. In study 1, the molecular and biological characterization of 81 cysts of goats, sheep, cattle and pigs from Neuquén was carried out. The presence of the G1, G6 and G7 genotypes and phenotypic differences according to the genotype between the cysts of the different IH was demonstrated. The genetic microdiversity of the *E. granulosus* sensu lato *cox1* partial gene was evaluated and haplotype-anatomical location relationship was found in sheep: original G1-hepatic location; G1nqnB-pulmonary location.

In study 2, the molecular, biological and clinical characterization of human cysts from Neuquén was carried out. One hundred and forty-nine cysts were genotyped from 108 patients. The G1, G3, G6 and G7 genotypes were identified among human cysts, showing an heterogeneous geographical distribution. A human infected with G3 was described for the first time in Argentina. This study is the first report in the Americas that describes a human infection with *E. canadensis* G7 and the second report worldwide about a co-infection with two different species and genotypes (G1 and G7) of *E. granulosus* sensu lato in humans. Genetic microdiversity of *E. granulosus* sensu lato *cox1* complete gene haplotypes was evaluated in human cysts and three *E. granulosus* sensu stricto haplotypes and five *E. canadensis* haplotypes were described for the first time. There are simultaneous and active cycles of several species and genotypes of *E. granulosus* sensu lato in Neuquén, all infective for humans, with sheep being the reservoir for G1, goats for G6 and swine for G7. The relationship between the human cysts genotype and different clinical characteristics of the patient and the cysts was evaluated. The most relevant results showed

that there is association between G1 and liver location, and G6 and lung location. Furthermore, in hepatic cysts, a relationship was observed between G1 and the active stage of cysts, and G6 and the inactive stage of cysts.

In Study 3, the immunological aspects of infection by *E. granulosus sensu lato* in humans were analyzed. The sensitivity of three commercial serological tests was evaluated: ELISA IgG, rapid immunochromatographic test (RIT) and indirect hemagglutination (IHa). RIT and ELISA IgG showed greater sensitivity than IHa for the detection of antibodies against *E. granulosus sensu lato* in human serum samples. The immune response of the patients was evaluated using the RIT and ELISA IgG tests in relation to different variables, and it was observed that it was affected by the size of the cyst, the stage in liver cysts and by the amount of cysts per patient. The protein profiles of hydatid fluids (HF) from livestock and humans from Neuquén showed differences related to the type of host, genotype, location and fertility of the cysts. The antigenic composition of the HF from the cysts of different IH and humans was evaluated by confronting the protein profile of the HF with sera from patients with confirmed hydatidosis, taking into account the genotype of the cysts with which these patients were infected. Differences in the antigenic composition of the HF of different IH and humans were observed, attributed to differences in IH, genotype and fertility of cyst and the genotype of the cyst that infected patients. Antigen B was present in most of the HF analyzed but with differences in the amount of antigenic bands, suggesting that it could be used for the immunodiagnosis of human hydatidosis.

The obtained results allow to conclude that there is significant genetic and phenotypic variability between the species and genotypes of *E. granulosus sensu lato* in the different IH and humans present in the province of Neuquén. The generated knowledge allows a better understanding of the transmission of CE, the biology of the parasite, the genotypes present in the different IH and humans and their geographical distribution, as well as the clinical and immunological aspects of the infection. This knowledge is very useful to be applied in the design of new strategies in the Neuquén hydatidosis control program, more adapted to the biological characteristics of the species and genotypes of *E. granulosus sensu lato* present in this region, in order to optimize control and surveillance of the disease in the province. Furthermore, this knowledge could be useful to review current recommendations on the diagnosis and management of patients with CE at provincial level. The implementation of more efficient measures will help to reduce CE endemicity and therefore improve the health of the population.

ABREVIATURAS

ABZ: albendazol	kDa: kilodalton
ADN: ácido desoxirribonucleico	kg: kilogramos
Ag5: antígeno 5	Km ² : kilómetros cuadrados
AgB: antígeno B	LH: líquido hidatídico
CD: cúmulo de diferenciación	mA: miliamperio
CeDen: células dendríticas	mg: miligramos
cm: centímetros	ml: mililitros
<i>cox1</i> : gen codificante de la subunidad 1 de citocromo oxidasa	mm: milímetros
DE: desvío estándar	mM: milimolar
dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato	OMS: Organización Mundial de la Salud
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	p/v: relación peso/volumen
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	pb: pares de bases
EQ: echinococcosis quística	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
hab: habitantes	PGE2: prostaglandina E2
HAI: hemoaglutinación indirecta	PM: peso molecular
HCl: ácido clorhídrico	PSC: protoescólices
Hd: diversidad de haplotipos	PVDF: fluoruro de polivinilideno
HD: hospedador definitivo	QH: quiste hidatídico
HI: hospedador intermediario	R ² : coeficiente de regresión lineal
hs: horas	SDS: dodecil sulfato de sodio
IAP: incidencia anual promedio	SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
IB: inmunoblot	TA: temperatura ambiente
IC: intervalo de confianza	<i>Taq</i> polimerasa: ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
IFN- γ : interferón gama	TBE: Tris- bórico EDTA
Ig: inmunoglobulina	TBS: buffer Tris salino
IL: interleuquina	

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TH: linfocito T helper

TIR: test inmunocromatográfico rápido

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Treg: linfocitos T reguladores

V: voltios

X: promedio

χ^2 : prueba de chi-cuadrado

μg : microgramos

μl : microlitros

μM : micromolar

π : diversidad nucleotídica

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El parásito

Echinococcus (Rudolphi, 1801) es un endoparásito de distribución cosmopolita que pertenece a la clase Cestoda, del phylum Platyhelminthes (Figura 1). El género *Echinococcus* es un grupo monofilético de especies que tiene un ciclo de vida indirecto de dos hospedadores, en el que el adulto (de pequeño tamaño) que se reproduce sexualmente es hermafrodita y la larva o metacestodo, prolifera asexualmente.

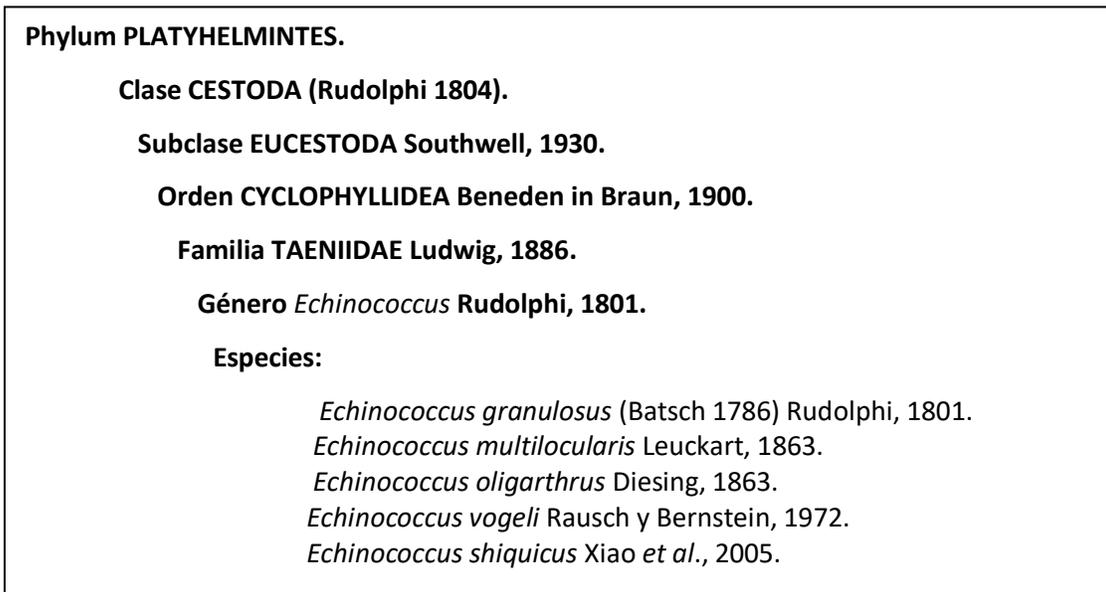


Figura 1. Clasificación taxonómica del género *Echinococcus*.

Los hospedadores definitivos (HD) son carnívoros, usualmente cánidos o félidos. Los HD adquieren la infección por comer vísceras crudas de herbívoros u omnívoros, que actúan como hospedadores intermediarios (HI). Los humanos actúan como hospedadores sin salida. En los HI y en los humanos la infección se conoce como echinococcosis quística (EQ) o hidatidosis.

La taxonomía del género *Echinococcus* es actualmente motivo de controversia y se encuentra en permanente revisión debido al descubrimiento de nuevas especies y a la gran variabilidad intraespecífica que presenta *E. granulosus* (Tappe et al., 2010). Hasta hace poco tiempo se reconocían cuatro especies dentro del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, causante de la echinococcosis quística; *E. multilocularis*, causante de la echinococcosis

alveolar; *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, causantes de la echinococcosis poliquistica. En el año 2005 Xiao *et al.* describieron una nueva especie de *Echinococcus* en mamíferos del Tibet (*Ochotona curzoniae*) y zorros (*Culpes ferrilata*), a la que denominaron *E. shiquicus* (Xiao *et al.*, 2005). Sin embargo, se considera una especie hermana de *E. multilocularis* (Lymbery, 2017).

Estudios filogenéticos recientes, basados en la secuencia nucleotídica de genes de proteínas nucleares y la secuencia de todos los genes mitocondriales, revelaron que *E. granulosus* comprende varias especies definidas inicialmente de manera incorrecta, que han sido diferenciadas como genotipos de acuerdo al HI al que mostraban mejor adaptación, tal como se discute más adelante en el ítem 1.3. (Romig *et al.*, 2015). Se ha adoptado la terminología de *E. granulosus* sensu lato como término general que agrupa a todas las especies y genotipos de *E. granulosus* (Spickler, 2011).

1.2. Morfología y ciclo biológico de *E. granulosus* sensu lato

El parásito *E. granulosus* sensu lato es un típico cestodo-tenia que requiere de dos hospedadores mamíferos para completar el ciclo de vida: un HD carnívoro en cuyo intestino se desarrolla el cestodo adulto, y un HI herbívoro u omnívoro en el cuál se desarrolla el metacestodo, usualmente en las vísceras.

1.2.1. Morfología del estadio adulto

Los pequeños adultos del parásito (miden como máximo 7 mm) poseen un órgano especializado de fijación, el escólex, que presenta rostelo con una doble corona de ganchos alternados entre grandes y pequeños, y cuatro ventosas musculares. El cuello, una región estrecha, separa el escólex del resto del cuerpo, estróbila, que es segmentado y consta de varias unidades reproductivas (proglótides) (Thompson, 2017) (Figura 2). Estos proglótides presentan diferentes estadios de maduración: inmadura, madura y grávida. Tras la fecundación del parásito, que generalmente se lleva a cabo por autofecundación (Haag *et al.*, 1999), se producen los huevos en el interior del último y/o penúltimo proglótide (grávido) que se desprende del resto de los proglótides del adulto.

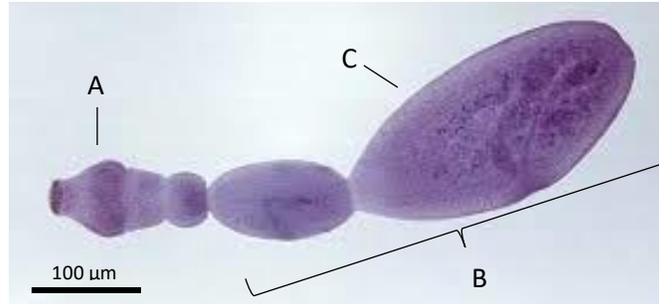


Figura 2. *E. granulosis sensu lato* adulto. A: escólex; B: estróbila; C: proglótide.

1.2.2. Morfología del huevo

El tamaño de los huevos varía entre 30-50 μm y entre 22-44 μm en sus dos diámetros. El embrióforo es la capa principal que brinda protección física al embrión u oncosfera (Figura 3), ya que la capa vitelina (envoltura externa) y la cápsula se eliminan pasivamente del huevo antes de que se libere. El embrióforo es relativamente grueso e impermeable (Morseth, 1965; Swiderski, 1983). Los huevos son extremadamente resistentes, lo que les permite soportar una amplia gama de temperaturas ambientales durante muchos meses (Sánchez Thevenet *et al.*, 2005).

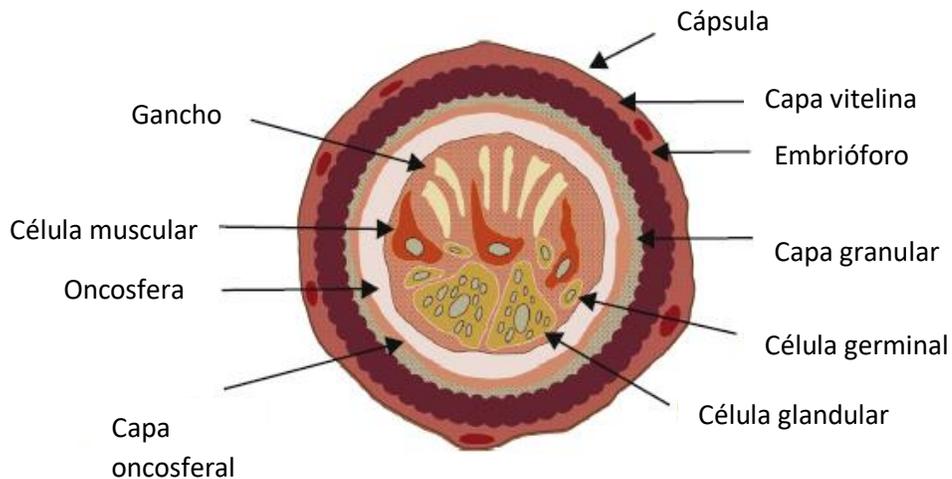


Figura 3. Esquema de la estructura del huevo de *E. granulosis sensu lato* (Fuente: Thompson, 2017).

La oncosfera, también llamada embrión hexacanto por poseer seis ganchos, posee en su interior un conjunto de células germinales, musculares y glandulares. La estructura compleja de la oncosfera le permite evadir la respuesta del sistema inmune del HI para establecerse y transformarse en quiste (Swiderski, 1983). Los ganchos de la oncosfera están asociados a un sistema muscular complejo que les permite cortar el epitelio intestinal del HI para penetrar en el tejido.

1.2.3. Morfología del metacestodo

El metacestodo o quiste hidatídico (QH) completamente desarrollado de *E. granulosus* sensu lato es típicamente unilocular, de forma subesférica y lleno de líquido (Thompson, 1995). El quiste consiste en una capa germinal o nucleada interna rodeada externamente por una capa laminada acelular, elástica y resistente, de espesor variable. El QH se encuentra rodeado por una capa adventicia fibrosa producida por la respuesta inmune del hospedador (Figura 4). Típicamente, *E. granulosus* sensu lato produce un quiste unilocular de una sola cámara en el cual el crecimiento es expansivo por agrandamiento concéntrico. La proliferación asexual de la capa germinal y la formación de vesículas hijas se lleva a cabo de manera totalmente endógena. Se pueden formar dentro del QH cámaras secundarias, parcialmente separadas por tabiques incompletos, que se comunican con la cavidad central (Vanek, 1980). En algunos hospedadores, particularmente en humanos, donde pueden desarrollarse quistes inusualmente grandes, pueden formarse quistes hijos dentro del quiste primario (Thompson, 2001; Moro & Schantz, 2009).

La capa germinal tiene la capacidad de proliferar de manera asexual, lo que da lugar a la formación de las cápsulas prolíferas, donde se lleva a cabo la producción de numerosos protoescólices (PSC). La formación de PSC es asincrónica, por lo que en una misma cápsula prolífera pueden encontrarse al mismo tiempo PSC en diferentes estadios de desarrollo (Thompson, 1995; Díaz *et al.*, 2011b).

La capa laminar ayuda al soporte del quiste y permite que se desarrolle una tensión intraquística considerable. Es un complejo de carbohidratos y glucoproteínas de mucina altamente glicosiladas (Kilejian & Schwabe, 1971). Es una interfaz destacada y especializada

en el HI que proporciona una barrera fisicoquímica con aparente multifuncionalidad (Díaz *et al.*, 2011a, b; Thompson & Jenkins, 2014). El papel de la capa laminar parece ser de protección al modular la interfaz hospedador-parásito, ya que la supervivencia del quiste depende de su integridad (Gottstein *et al.*, 2002; Stadelmann *et al.*, 2010). Puede proteger al quiste del ataque inmunológico al ofrecer una barrera inmunológicamente inerte que impide el acceso a las células de defensa del hospedador. Sin embargo, las inmunoglobulinas pueden pasar a través de la capa laminada, pero la capacidad de regular la penetración de macromoléculas en el quiste parece ser una función de la capa germinal más que la laminar (Coltorti & Varela-Díaz, 1974; Thompson 2017).

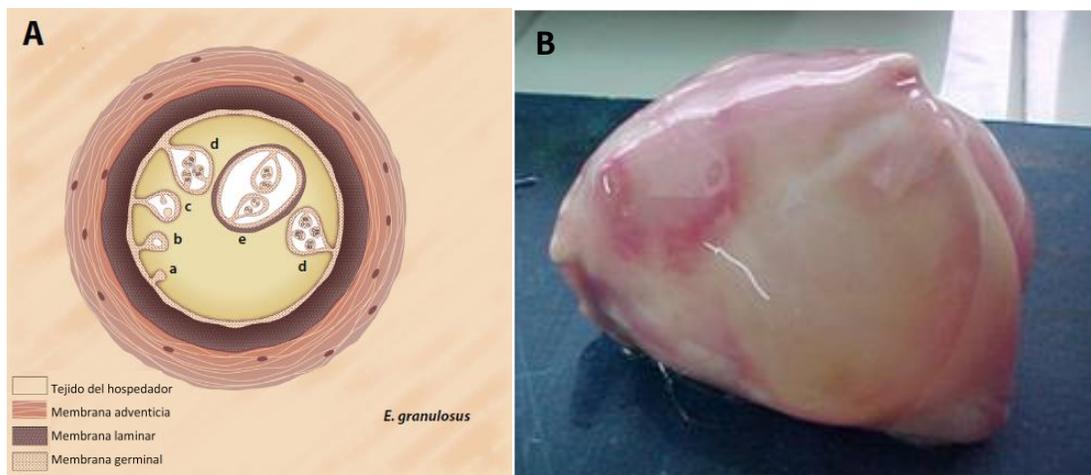


Figura 4. Metacestodo. A) esquema del quiste hidatídico. a-d) estadios de desarrollo de los protoescólices y cápsulas prolíferas; e) vesículas hijas (Fuente: Thompson & Jenkins, 2014). B) quiste hidatídico de origen caprino, unilocular, hialino de 10,4 cm de diámetro. (Fotografía tomada en el presente trabajo de tesis).

La capa adventicia es el producto de una reacción inflamatoria celular del HI en estadios tempranos luego del desarrollo postoncoferal (Cameron & Webster, 1969; Smyth & Heath, 1970; Slais & Vanek, 1980). La intensidad inicial de esta reacción varía entre los HI y define el destino del metacestodo en desarrollo. Si la reacción es demasiado intensa causará la degeneración y la muerte final del parásito, mientras que en los HI adecuados la reacción inicial se resuelve, dejando una capa fibrosa. La última situación es común cuando ha evolucionado una relación estable entre el hospedador y el parásito (Rausch, 1997). La

formación de la capa fibrosa adventicia contribuye al control del HI sobre el crecimiento de los QH (Gottstein *et al.*, 2017).

Los PSC, las formas infectivas para el HD, van a dar origen al parásito adulto. Los PSC completamente desarrollados se caracterizan por un escólex invaginado con ganchos y ventosas, y un cuerpo con numerosos corpúsculos calcáreos (Figura 5). Los PSC de *E. granulosus* sensu lato muestran un notable grado de morfogénesis heterogénea, con la habilidad de desarrollarse en una dirección vesicular o estrobilar. El desarrollo vesicular se produce cuando un PSC que escapa de un QH puede desarrollar un nuevo QH en el mismo hospedador. Esto puede suceder cuando se produce la ruptura de un QH de manera espontánea, por un traumatismo o provocada en forma accidental en una intervención quirúrgica. Los PSC liberados pueden desarrollar un nuevo metacestodo, dando lugar a una hidatidosis secundaria que puede presentar distintas localizaciones. Si en lugar de una ruptura, el PSC es ingerido por el HD adecuado se convertirá en un adulto (Thompson, 1995; Cucher *et al.*, 2011).

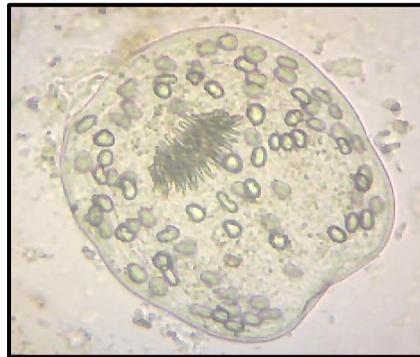


Figura 5. Protoescólices con corona de ganchos y corpúsculos calcáreos. Microfotografía (400x) tomada en el presente trabajo de tesis.

El líquido hidatídico (LH) es una mezcla biológica compleja de varios compuestos solubles, como glicoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales, e incluye tanto moléculas del hospedador como macromoléculas del parásito (Mohammed *et al.*, 2018). En el LH se ha descrito la presencia de proteínas séricas del HI, incluyendo albúmina, hemoglobina e inmunoglobulinas. El mecanismo de transporte de las proteínas del hospedador hacia el interior del metacestodo no se conoce totalmente. Se propone que

podría ser por difusión a través de las capas, por endocitosis tegumental y/o por mecanismos de transporte especializados (Coltorti & Varela-Diaz, 1974; Thompson, 2017).

1.2.4. Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus sensu lato*

El parásito presenta un ciclo de vida indirecto, dado que requiere de dos hospedadores para poder completarlo (Thompson, 1995). El HD es un animal carnívoro, generalmente el perro, zorro u otros cánidos, que aloja en su intestino delgado a la forma adulta del parásito, mientras que el HI es un animal herbívoro u omnívoro, incluyendo ungulados domésticos (oveja, vaca, cerdo, caballo, camello, cabra) que aloja en sus vísceras a la forma larvaria o metacestodo (Figura 6).

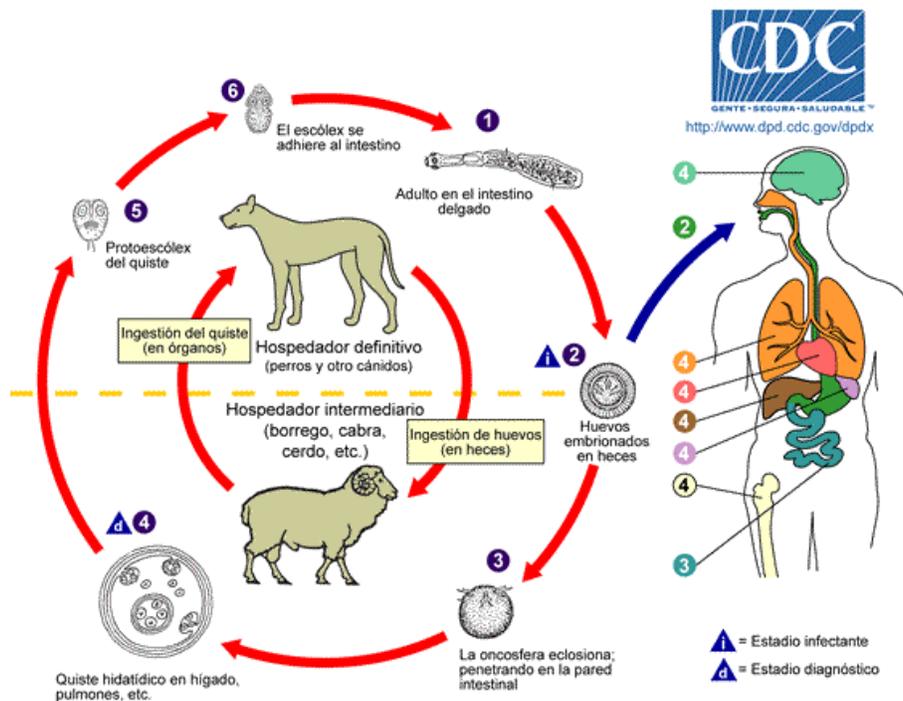


Figura 6. Ciclo biológico de *E. granulosus sensu lato*: 1) parásito adulto; 2) huevo embrionado; 3) oncosfera; 4) quiste; 5) protoescólex; 6) protoescólex evaginado. En el humano: 3) oncosfera liberada en el intestino; 4) quistes en distintos órganos (hígado, pulmón, hueso, páncreas, corazón, cerebro) (Fuente: <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>).

El adulto de *E. granulosus sensu lato* es hermafrodita segmentado en el que cada segmento presenta órganos sexuales masculinos y femeninos. La madurez sexual del adulto

se alcanza en el último y/o penúltimo proglótide grávido a las 4 o 5 semanas post infección, produciendo huevos que se liberan al ambiente junto a las heces del HD. El HI se infecta por exposición oral a huevos que contengan la oncosfera, por ejemplo cuando ingiere alimentos o agua contaminada con los huevos del parásito. Una vez que el huevo es ingerido por el HI, se libera la oncosfera por acción de las secreciones gástricas que disuelven el embrióforo. La oncosfera se activa por acción del cambio de pH y secreciones en el intestino. Luego, la oncosfera penetra el epitelio intestinal y la lámina propia por medio de sus ganchos móviles y secreciones de las glándulas de penetración. Una vez que se encuentra en la submucosa del intestino, la oncosfera alcanza los capilares sanguíneos y luego es transportada pasivamente por la circulación del sistema portal hepático del HI hacia el hígado (Heath, 1971; Brehm & Koziol, 2017). Algunas oncosferas son retenidas en este primer órgano de impacto, mientras que otras llegan a los pulmones, y unas pocas son transportadas a otros órganos, tales como riñones, bazo, huesos, cerebro, etc. Tras establecerse en el órgano blanco, la oncosfera da origen al estadio larvario, metacestodo. Aproximadamente cinco días luego de la ingestión de la oncosfera, el metacestodo es una pequeña vesícula de 60 a 70 μm de diámetro (Eckert & Deplazes, 2004).

Cuando el metacestodo alcanza la fertilidad genera los PSC por reproducción asexual. Cuando el HD ingiere vísceras de animales infectados, los PSC se establecen en el intestino delgado y se diferencian a adulto, cerrando así el ciclo de vida del parásito. Es por ello que si bien el humano podría actuar como HI alojando al metacestodo en sus vísceras, se considera un “hospedador sin salida”. Un hospedador sin salida no puede participar en el ciclo de vida porque está fuera del rango de presas de los HD (Romig *et al.*, 2017).

El ciclo de vida puede ser doméstico o silvestre. El término “ciclo de vida doméstico” se utiliza cuando los perros domésticos y el ganado son las principales especies hospedadoras, aunque los animales salvajes podrían contribuir de manera marginal a la transmisión. “Ciclo de vida silvestre” significa que la transmisión es principalmente mantenida por mamíferos salvajes, sin la participación esencial de especies domésticas (Romig *et al.*, 2017).

1.3. Especies y genotipos de *Echinococcus granulosus sensu lato*

Como se comentó previamente, con el nombre de *E. granulosus sensu lato* se engloban varias especies, algunas no bien definidas todavía. Una característica importante de este complejo es el hecho de que comprende numerosas variantes intraespecíficas que presentan diferencias considerables a nivel genético. Inicialmente, se utilizó el término “cepa” para referirse a variantes intraespecíficas descritas a partir de las diferencias en la especificidad del hospedador, la distribución geográfica, la morfología, la biología del desarrollo, infectividad en humanos, la antigenicidad, la sensibilidad a los fármacos y la patogenicidad (Thompson, 1986; Thompson & Lymbery, 1988, 1990; Thompson, 1995; Thompson & McManus, 2001, 2002; Thompson, 2008). Estudios de genética molecular, basados principalmente en la secuenciación parcial del ADN mitocondrial, condujeron a la nomenclatura "genotipo" para las variantes intraespecíficas dentro de *E. granulosus sensu lato* que presentan diferencias a nivel genómico: G1 (cepa oveja); G2 (cepa oveja de Tasmania); G3 (cepa búfalo); G4 (cepa caballo); G5 (cepa vaca); G6 (cepa camello); G7 (cepa cerdo); G8 (cepa ciervo americano); G9; y G10 (cepa ciervo europeo) (Bowles *et al.*, 1992, 1994; Bowles & McManus, 1993; Scott *et al.*, 1997; Lavikainen *et al.*, 2003).

Hacia mediados de los 90, a partir de análisis filogenéticos, de información morfológica y de secuencia de ADN mitocondrial, se sugirió que *E. granulosus sensu lato* era un grupo parafilético. Las primeras revisiones taxonómicas dividieron *E. granulosus sensu lato* en cuatro especies: *E. granulosus sensu stricto* para G1, G2 y G3; *E. equinus* para G4; *E. ortleppi* para G5; y *E. canadensis* para G6, G7, G8 y G10 (Thompson *et al.*, 1995; Thompson & McManus, 2002; Nakao *et al.*, 2007).

Hüttner *et al.* reportaron en 2008 la especie *E. felidis* originalmente descrita por Ortlepp (1934, 1937) en África subsahariana. Actualmente esta especie se conoce por presentar un ciclo de vida silvestre siendo los leones y las hienas manchadas los HD, y los jabalíes los HI. Esta especie forma un clado con su especie hermana *E. granulosus sensu stricto*, formando parte del complejo *E. granulosus sensu lato* (Hüttner *et al.*, 2008, 2009).

El genotipo G9 fue descrito por Scott *et al.* (1997) en quistes procedentes de humanos. Actualmente, no se considera un genotipo de *E. granulosus sensu lato* ya que se

encontró en estudios posteriores que no presentaba diferencias con el genotipo G7 (Kedra *et al.*, 1999).

Recientemente Kinkar *et al.* (2017) demostraron, mediante el análisis del genoma mitocondrial casi completo y tres genes nucleares, que los genotipos G1 y G3 pueden ser tratados como una sola especie de *E. granulosus* sensu stricto. Concluyeron que los genotipos G1 y G3 deben ser considerados como genotipos distintos cuando se realiza el análisis de genes mitocondriales y recomendaron que G2 sea excluido de la lista de genotipos debido a que no es un grupo monofilético, sino que pertenece a una variante de G3.

En el año 2016 Wassermann *et al.* describieron un nuevo genotipo (G_{omo}) en un humano en el sureste de Etiopía añadiendo mayor complejidad a la taxonomía de *Echinococcus*. G_{omo} se encuentra relacionado con *E. granulosus* sensu stricto, pero su posición taxonómica es aún inconclusa.

Actualmente, el estatus de especie de los genotipos G6, G7, G8 y G10 de *E. granulosus* sensu lato continúa incierto. En base a estudios filogenéticos, sumados a las características biológicas, la especificidad de HI y los datos epidemiológicos, se han propuesto dos clasificaciones taxonómicas para estos 4 genotipos. La primera propuesta, basada en el análisis filogenético de genes mitocondriales, sugiere que los genotipos G6-G10 deberían agruparse en una única especie denominada *E. canadensis* (Nakao *et al.*, 2007, 2013; Moks *et al.*, 2008). Sin embargo, el genoma mitocondrial solamente revela el linaje maternal de la historia evolutiva, que puede ser diferente a la evolución de la especie. Debido a este motivo se realizó una segunda propuesta basada en el análisis filogenético de genes nucleares. Esta segunda hipótesis propone que los genotipos G6 y G7 conformarían la especie *E. intermedius* y los genotipos G8 y G10 conformarían la especie *E. canadensis* (Thompson, 2008; Saarma *et al.*, 2009; Laurimäe *et al.*, 2018) (Tabla 1). En relación a esta segunda propuesta, Laurimäe *et al.* (2018) plantean que se debe formular un nombre distinto a *E. intermedius* para los genotipos G6/G7. Este nombre resulta confuso para la nueva clasificación debido a que en el año 1943 Lopez-Neyra y Soler Planas describieron

una especie llamada *E. intermedius*. Sin embargo, no describieron ningún HI y no se volvió a encontrar ningún tipo de espécimen original para *E. intermedius* (Nakao *et al.*, 2015).

En el presente trabajo de tesis se considerará que *E. canadensis* comprende a los genotipos G6 a G10.

Tabla 1. Propuestas de clasificación taxonómica del género *Echinococcus*

Clasificación en base a genes mitocondriales	Clasificación en base a genes nucleares
Género: <i>Echinococcus</i>	Género: <i>Echinococcus</i>
Especies:	Especies:
- <i>E. multilocularis</i>	- <i>E. multilocularis</i>
- <i>E. oligarthrus</i>	- <i>E. oligarthrus</i>
- <i>E. vogeli</i>	- <i>E. vogeli</i>
- <i>E. shiquicus</i>	- <i>E. shiquicus</i>
- Complejo <i>E. granulosus</i> sensu lato	- Complejo <i>E. granulosus</i> sensu lato
- <i>E. granulosus</i> sensu stricto (G1 y G3)	- <i>E. granulosus</i> sensu stricto (G1 y G3)
- <i>E. equinus</i> (G4)	- <i>E. equinus</i> (G4)
- <i>E. ortleppi</i> (G5)	- <i>E. ortleppi</i> (G5)
- <i>E. canadensis</i> (G6, G7, G8 y G10)	- <i>E. intermedius</i> (G6 y G7)
- <i>E. felidis</i>	- <i>E. canadensis</i> (G8 y G10)
	- <i>E. felidis</i>

1.3.1. Microdiversidad de los genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato

La nomenclatura utilizada por Bowles *et al.* (1992) era muy importante en los 90 debido a que era una forma de diferenciar las variantes genéticas de *E. granulosus* sensu lato que se conocían en ese momento. Sin embargo, actualmente estas designaciones son insuficientes para describir la variabilidad intraespecífica de *E. granulosus* sensu lato, que

ahora se sabe que es sustancialmente mayor de lo que se pensaba anteriormente (Nakao *et al.* 2013; Romig *et al.* 2015).

Varios autores han identificado una variabilidad esencialmente mayor en la secuencia parcial del gen mitocondrial *cox1* que la descrita por Bowles *et al.* (1992). En el año 2002, Kamenetzky *et al.* encontraron que 10 aislamientos no tenían completa identidad con el fragmento *cox1* de 366 pb para el genotipo G1 y un aislamiento para el genotipo G7 descrito por Bowles *et al.* (1992). Estos aislamientos correspondían a seis variantes que diferían en un nucleótido cada una y sólo en uno de estos casos el cambio de un nucleótido producía un cambio de aminoácido (Kamenetzky *et al.*, 2002). En la provincia de Neuquén, se describieron cuatro variantes de *E. granulosus* sensu stricto G1, que diferían en un nucleótido cada una, que se denominaron G1nqnB, G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE (Soriano *et al.*, 2010; Soriano, 2011; Pierangeli, 2013).

El ADN mitocondrial carece de los aspectos aleatorios de la meiosis y la singamia que afectan al ADN nuclear durante la reproducción sexual, por lo cual las mutaciones solamente explican la variedad genética del ADN mitocondrial que se observa a menudo en las poblaciones animales. Las variaciones del ADN mitocondrial se conocen como haplotipos, y se diferencian entre sí por las mutaciones acumuladas desde la última vez que se compartieron los ancestros femeninos. Debido al rápido ritmo de la evolución del ADN mitocondrial, muchos haplotipos diferentes suelen coexistir dentro de una especie. Las secuencias de haplotipos pueden ser utilizadas para estimar las historias matrilineales de individuos y poblaciones (Avice, 2008).

Existe una creciente evidencia de que el uso de secuencias más largas del gen *cox1* u otros genes permite la descripción de la variabilidad intraespecífica de *E. granulosus* sensu lato en una resolución mayor que la establecida por Bowles *et al.* (1992). La importancia de conocer la microdiversidad de *E. granulosus* sensu lato reside en la posibilidad de que los diferentes haplotipos puedan diferenciarse en distintas características fenotípicas como la especificidad por el hospedador e incluso parámetros relacionados al diagnóstico y respuesta a vacunas. La variabilidad genética también tiene el potencial de influir en la efectividad de las prácticas de manejo clínico, debido a las diferencias en la patogenicidad

o la respuesta a los medicamentos como lo sugieren Romig *et al.* (2015). Otro aspecto importante del estudio de la diversidad de haplotipos de *E. granulosus* sensu lato es que contribuye a la filogeografía del parásito, es decir, a entender cómo se dispersó en el mundo (Alvarez Rojas *et al.*, 2016). Hasta el momento, se han realizado escasos estudios sobre la variabilidad genética en humanos infectados con *E. granulosus* sensu lato en Neuquén. Ninguno de estos estudios involucró el análisis de la secuencia completa del gen mitocondrial *cox1*, la descripción de los haplotipos presentes, ni la filogeografía del parásito.

1.4. Patrones del ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* sensu lato

Las especies del complejo *E. granulosus* sensu lato presentan un sistema predador-presa para el mantenimiento del ciclo de vida. Los HD pertenecen exclusivamente al orden Carnivora, principalmente a la familia Canidae, en menor grado a la familia Felidae y Hyaenidae. Los HI cubren una gama mucho más amplia. Considerando el gran número de especies donde los metacestodos pueden desarrollarse -tan distantes filogenéticamente entre sí como marsupiales, roedores y rumiantes- parece que el parásito puede adaptarse principalmente a cualquier especie de presa de un HD particular, siempre que sea un mamífero. Esta capacidad intrínseca está incluso enfatizada por la larga lista de especies de hospedadores sin salida que no juegan un rol en el ciclo de vida, pero que los metacestodos pueden desarrollarse incluso en condiciones de fertilidad (Romig *et al.*, 2017).

Sin embargo, esta característica del complejo se expresa diferente cuando se analiza a nivel de las especies de *E. granulosus* sensu lato. El grado de especificidad del HI está bien correlacionado con el potencial de infectar humanos de varias especies del parásito. Aparte de las especies de *E. granulosus* sensu lato con predominio de un ciclo de vida doméstico, el parásito puede explotar diferentes sistemas predador-presa en diferentes áreas geográficas o incluso en diferentes hábitats en la misma área. Los ciclos de vida en un área suelen ser simples, pero la mayoría de las veces involucra sistemas multihospedador, donde varias especies de HD pueden cazar varias especies de HI (Romig *et al.*, 2017).

1.4.1. *Echinococcus granulosus* sensu stricto

La especie *E. granulosus* sensu stricto (G1-G3) se transmite predominantemente por un ciclo de vida doméstico involucrando perros y ganado. El 88% de los casos en humanos en el mundo son producidos por esta especie (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). El alto número de casos humanos refleja la amplia distribución y la alta frecuencia en perros y ganado, pero aparentemente la baja especificidad por el HI también podría contribuir a una mayor infectividad para los humanos comparado con otras especies de *E. granulosus* sensu lato que producen hidatidosis.

Echinococcus granulosus sensu stricto se encuentra bien adaptada a las ovejas como HI, lo que se refleja en la alta prevalencia y las altas tasas de fertilidad de los quistes. El resto de las especies de ganado (cabras, vacas, camellos, alpacas, cerdos, burros) desarrollan quistes fértiles y por lo tanto contribuyen a la transmisión, pero por lo general se los considera menos importantes para el ciclo de vida debido a la baja prevalencia, fertilidad de los quistes o disponibilidad para los perros (Romig *et al.*, 2017). Los caballos pueden ser infectados con *E. granulosus* sensu stricto, pero hasta ahora sólo se describieron quistes infértiles (Varcasia *et al.*, 2008; Utuk & Simsek, 2013).

La misma especie de *E. granulosus* sensu stricto puede adaptarse en un área determinada de manera diferente a una especie hospedadora en comparación con otra. Además de la susceptibilidad a la infección y el potencial de desarrollar quistes fértiles, existen otros factores que determinan la contribución relativa de diferentes especies de ganado en una región determinada. Resulta importante la accesibilidad de los quistes por parte de los perros, que por ejemplo puede ser alto en el caso de las ovejas que son sacrificadas de manera clandestina y bajo en el ganado bovino que suele venderse vivo y faenado en mejores condiciones higiénicas (Addy *et al.*, 2012). La infección de los perros se produce mediante la alimentación de vísceras crudas después de las faenas domiciliarias, el manejo incorrecto de los mataderos (donde los perros vagabundos tienen acceso a las vísceras del ganado sacrificado) o por perros callejeros que buscan en los restos de ganado que quedan en el pasto.

Echinococcus granulosus sensu stricto presenta baja especificidad por el HI para desarrollar el estadio metacestode, esto se refleja en la gran cantidad de HI accidentales que no forman parte del ciclo de vida de esta especie, que va desde el desarrollo de quistes en roedores (Yang *et al.*, 2009) a echinococcosis abdominal en gatos domésticos (Deplazes, 2015).

1.4.2. *Echinococcus equinus*

La especie *E. equinus*, descrita en Inglaterra en los años 70s, presenta un ciclo de vida doméstico donde los caballos actúan como HI y los perros, fundamentalmente de caza, como HD (Thompson & Smyth, 1975; Smyth, 1977). También se ha reportado la transmisión del parásito de burros y mulas a perros callejeros (Aboelhadid *et al.*, 2013; Simsek & Cevik, 2014; Simsek *et al.*, 2015). No hay reportes de casos en humanos. Se describió una transmisión exclusivamente selvática de *E. equinus* en Namibia donde los leones y los chacales de lomo negro actúan como HD, y las cebras comunes son portadores de los metacestodos (Wassermann *et al.*, 2015).

1.4.3. *Echinococcus ortleppi*

Echinococcus ortleppi está bien adaptada a los bovinos como HI, produciendo quistes con una tasa elevada de fertilidad y localizados generalmente en los pulmones (Tigre *et al.*, 2016). Esta especie ocurre en todo el mundo y presenta ciclos de vida domésticos entre el ganado vacuno y los perros. Sin embargo, al comparar con *E. granulosus* sensu stricto esta especie suele ser menos frecuente incluso en las regiones ganaderas. Esto puede deberse a que el ganado vacuno se vende mayormente vivo para ser transportado a mataderos distantes; por lo tanto, los quistes en el ganado vacuno son menos frecuentes para los perros locales, creando una barrera para la infección del ganado con *E. ortleppi* (Addy *et al.*, 2012).

Aunque *E. ortleppi* es la especie más importante de *E. granulosus* sensu lato que produce quistes fértiles en ganado vacuno, no hay una especificidad estricta por el HI. Se

ha descrito el desarrollo de quistes fértiles en cabras, cerdos, cebras y jirafas (Romig *et al.*, 2017). La infección en humanos suele ser muy rara (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

1.4.4. *Echinococcus canadensis*

Los genotipos G6 y G7 de la especie *E. canadensis* se caracterizan por tener generalmente un ciclo de vida doméstico, mientras G8 y G10 presentan un ciclo de vida silvestre.

Inicialmente, el genotipo G6 fue descrito por presentar un ciclo de vida doméstico donde los perros actúan como HD y los camellos como HI. Luego, también las cabras fueron consideradas como un HI importante, mientras que las ovejas rara vez se infectan (Soriano *et al.*, 2010). Tanto en camellos como en cabras, la tasa de fertilidad es muy alta (Thompson *et al.*, 1995; Soriano *et al.*, 2010; Addy *et al.*, 2012). Existe poca información sobre infecciones en bovinos, las infecciones suelen ser raras y la tasa de fertilidad es baja (Urach Monteiro *et al.*, 2016). Recientemente, se describió que el genotipo G6 infecta renos en la misma región donde se encuentran los genotipos G8 y G10 (Konyaev *et al.*, 2013). El genotipo G6 de *E. canadensis* es infeccioso para los humanos y es la segunda causa más común de echinococcosis humana (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

El genotipo G7 presenta generalmente un ciclo de vida doméstico, en el cual los perros actúan como HD y los cerdos como HI, produciendo quistes con una tasa elevada de fertilidad en muy poco tiempo (cerdos menores de 1 año) (Bruzinskaite *et al.*, 2009). Se sabe que el sistema de transmisión de perros-cerdos está asociado con la cría de cerdos de pequeños propietarios y las faenas clandestinas en los hogares. Se han descrito infecciones en lobos, zorros y jabalíes, lo que sugiere que este genotipo presenta un ciclo de vida silvestre (Daniel-Mwambete *et al.*, 2004; Guerra *et al.*, 2013; Umhang *et al.*, 2014b). Se han descrito muy pocos casos de echinococcosis humana producida por el genotipo G7 en el mundo, la mayoría de los casos se encuentran en el este de Europa y Sudáfrica (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

Los genotipos G8 y G10 presentan principalmente un ciclo de vida silvestre en el hemisferio norte. El genotipo G8 se ha descrito en lobos, que actúan como HD, y en

ciervos, bueyes y alces, que actúan como HI. Mientras que G10 infecta a lobos, como HD y ciervos, alces, bueyes y renos, como HI. Además, se han descrito casos de HI no cérvidos como cabras, cerdos domésticos, bisontes y otras especies de ciervo (Rausch & Williamson, 1959; Lavikainen *et al.*, 2003, 2006; Moks *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2013; Konyaev *et al.*, 2013; Schurer *et al.*, 2013). Los casos en humanos, tanto de G8 como de G10, suelen ser raros y frecuentemente se considera que constituye una enfermedad benigna (Castrodale *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2002; Jabbar *et al.*, 2011; Nakao *et al.*, 2013).

1.4.5. *Echinococcus felidis*

Esta especie fue descrita por primera vez en leones de Sudáfrica y posteriormente fue detectado en hienas manchadas, pero no se detectó en ningún otro carnívoro grande (Hüttner *et al.*, 2008). Existe poca información sobre el estadio metacestodo ya que hasta ahora sólo se describieron 6 quistes, todos de jabalíes. A pesar de que *E. felidis* se encuentra disperso por todo el este de África, no se registraron casos en humanos ni en ninguna especie de ganado en esa región; por lo tanto el ciclo de vida de esta especie es silvestre (Hüttner *et al.*, 2009).

1.5. Distribución global de *Echinococcus granulosus sensu lato*

Echinococcus granulosus sensu lato presenta una distribución mundial (Figura 7). La causa de enfermedad en humanos es muy variable en las distintas áreas endémicas. Dependen de factores de riesgo como el comportamiento humano, la diversidad y ecología de los hospedadores así como de la diversidad genética dentro de las especies de *Echinococcus*, que difieren en su potencial zoonótico y patogenicidad. A continuación se describirá la distribución de las distintas especies de *E. granulosus sensu lato* en los distintos continentes. Existen muchos reportes de EQ, sin embargo hay muy poca información sobre los genotipos responsables de la infección.

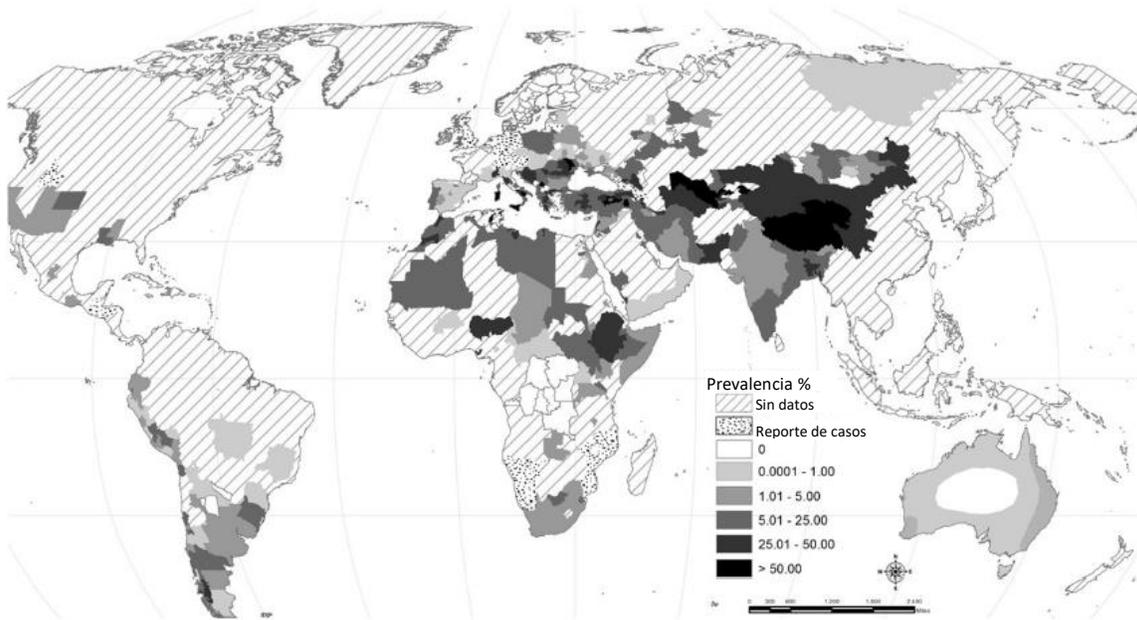


Figura 7. Distribución global actual de *E. granulosus* sensu lato causante de echinococcosis en los principales hospedadores intermediarios. No están incluidos los genotipos de cérvidos de *E. canadensis* y *E. equinus*. (Fuente: Deplazes *et al.*, 2017).

1.5.1. Epidemiología molecular en Europa

Actualmente, la EQ es la zoonosis producida por helmintos más importante en el sur de Europa, provocando consecuencias serias en salud pública y en la economía debido a las altas tasas de morbilidad tanto en la salud pública como en la industria ganadera (Seimenis, 2003). La transmisión en Europa se mantiene fundamentalmente por un ciclo de vida doméstico, sin embargo existe un ciclo de vida silvestre mantenido por lobos, jabalíes y cérvidos. Islandia se considera libre de transmisión de EQ desde hace décadas, luego de un programa de control exitoso (Schantz *et al.*, 1995; Sigurdarson, 2010).

Echinococcus granulosus sensu stricto (G1-G3) representa el principal agente causal de EQ en humanos del sur y en el sureste de Europa. Aunque el ciclo de vida involucra típicamente ganado (ovejas, vacas, cabras, búfalos, cerdos) y perros domésticos, también implica HI (ciervos rojos y jabalíes salvajes) y HD (perros callejeros, lobos y chacales) en España, Italia y Europa del este (González *et al.*, 2002; Daniel-Mwambete *et al.*, 2004; Varcasia *et al.*, 2007; Busi *et al.*, 2007; Beato *et al.*, 2010, 2013; Sherifi *et al.*, 2011; Bobic *et al.*, 2012; Onac *et al.*, 2013; Umhang *et al.*, 2013, 2014a; Grenouillet *et al.*, 2014; Mitrea *et al.*, 2014; Gori *et al.*, 2015; Roinioti *et al.*, 2016). Bulgaria es considerado el país con la mayor

tasa de morbilidad de EQ en humanos de los miembros de la Unión Europea (Breyer *et al.*, 2004; Jordanova *et al.*, 2015). Se han identificado infecciones con *E. granulosus* sensu stricto G1-G3 en perros, ovinos y bovinos en Inglaterra. En Alemania, al igual que en Inglaterra, la mayoría de los casos humanos reportados corresponden a inmigrantes (Deplazes *et al.*, 2017).

Echinococcus equinus G4 fue obtenida a partir de caballos, perros y dos mamíferos en cautiverio (una ceiba y un lemur) en Inglaterra (Boufana *et al.*, 2015b). También, existen reportes de *E. equinus* en caballos y perros en Irlanda, España e Italia (Hatch, 1970; Kumaratilake *et al.*, 1986; Varcasia *et al.*, 2008).

Echinococcus ortleppi G5 fue descrita en ganado bovino proveniente de Italia, España y en Córcega, Francia. En este último país se describió una infección hepática en dos humanos causada por *E. ortleppi* (Casulli *et al.*, 2008; Grenouillet *et al.*, 2014).

Echinococcus canadensis G7 es el principal agente de EQ en humanos de los países bálticos, ciclo mantenido principalmente por las prácticas de faena en el hogar, y se describió en humanos, cerdos, jabalíes y perros (Bruzinskaite *et al.*, 2009; Marcinkuté *et al.*, 2015). También, *E. canadensis* G7 es prevalente en cerdos y jabalíes salvajes de Francia, Grecia, Italia y Portugal. En este último país se han descrito también en bovinos como HI (con quistes fértiles) y lobos como HD infectados con este genotipo (Beato *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2013). El genotipo G7 fue identificado en cabras, ovejas, cerdos, ciervos rojos, jabalíes salvajes y humanos de Europa del este (Maillard *et al.*, 2009; Onac *et al.*, 2013; Chaligiannis *et al.*, 2015; Roinioti *et al.*, 2016). En un estudio retrospectivo realizado en Austria, el 92% (n=23) de 25 casos humanos autóctonos fueron pacientes infectados con G7, mientras que en el caso de inmigrantes con G1 o G6 (Schneider *et al.*, 2010).

Existen reportes de *E. canadensis* G8 y G10 en el norte de Europa donde el ciclo se perpetua entre lobos como HD y cérvidos como HI. En Finlandia, se describió un solo caso humano infectado con G10 (Oksanen & Lavikainen, 2015).

1.5.2. Epidemiología molecular en Asia

La infección con *E. granulosus* sensu lato en animales está distribuida por todo Rusia y refleja la amplia distribución de casos humanos observados, con elevada incidencia de EQ. Se han descrito infecciones con este parásito en humanos, ganado y animales salvajes como alces y renos. También se han descrito infecciones en perros y lobos que actúan como HD. Existen escasos estudios sobre los genotipos de *E. granulosus* sensu lato en Asia (Deplazes *et al.*, 2017).

Echinococcus granulosus sensu stricto es la especie responsable de la mayoría de las infecciones en humanos y animales en Asia (Deplazes *et al.*, 2017). Las ovinos, bovinos y caprinos son los principales HI de *E. granulosus* sensu stricto; sin embargo se ha demostrado que el ciclo se perpetúa en al menos 13 especies de mamíferos: oveja, cabra, vaca, búfalo, camello de una y dos jorobas, caballo, burro, cerdo, jabalí salvaje, oveja salvaje, gacela de bocio y babuino libre (Snábel *et al.*, 2009). En el año 2012, Konyaev *et al.* describieron un caso inusual de EQ en un gato doméstico de San Petersburgo causado por *E. granulosus* sensu stricto G1 (Konyaev *et al.*, 2012b, 2013). También, el genotipo G1 fue aislado de perros del sur de Kazajistán, el centro de Kirguistán, China y Mongolia (Trachsel *et al.*, 2007; Ziadinov *et al.*, 2008; Deplazes *et al.*, 2017).

Existe un solo reporte de un perro infectado con *E. equinus* G4 en Kirguistán y un perro en Jordania (Ziadinov *et al.*, 2008). Se detectaron infecciones con *E. ortleppi* G5 en vacas y búfalos de India, Nepal y Bután (Pednekar *et al.*, 2009). En 2013, Sharma *et al.* describieron un caso humano infectado con *E. ortleppi* G5. A pesar de que no existe evidencia del ciclo de transmisión de *E. granulosus* sensu lato en el sudeste de Asia, en el 2009 Plesker *et al.* describieron un caso interesante de infección de un primate cautivo con *E. ortleppi* en Vietnam adquirida localmente.

Echinococcus canadensis G6 fue descrito en perros, lobos, que actúan como HD y en humanos y distintos HI (camellos, cabras, jabalíes salvajes, vacas, renos) en Rusia, China y Mongolia (Konyaev *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Al Kitani *et al.*, 2015; Rostami *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). *Echinococcus canadensis* G6 es la segunda especie con mayor prevalencia en Medio Oriente y cada vez más detectada en humanos. *Echinococcus*

canadensis G7 fue descrito solamente en un humano de Turquía y en cuatro humanos del norte de China (Snábel *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2014).

Echinococcus canadensis G8 y G10 fueron descritos en ungulados salvajes (incluyendo, renos y alces), un humano (G10) y lobos de Yakutia y la región Altai de Rusia (Konyaev *et al.*, 2013). También se describieron casos de humanos y lobos infectados con G10 en China y Mongolia (Ito *et al.*, 2013; 2014).

1.5.3. Epidemiología molecular en Oceanía

La EQ fue declarada eliminada de Nueva Zelanda y se considera que la isla de Tasmania en Australia está provisionalmente libre de la enfermedad. Sin embargo, *E. granulosus* sensu stricto G1 y G3 está presente en Australia y todavía se encuentra en perros salvajes y rurales de la isla de Tasmania, pero con una baja prevalencia. En Australia, se describieron infecciones con G1 y G3 en varios HI (ovejas, vacas, canguros, ualabíes de distintas especies) y en HD (dingos, perros salvajes y rurales). Las notificaciones de humanos con EQ en Australia suelen ser esporádicas y una proporción significativa corresponde a inmigrantes recién llegados que contrajeron la infección antes de inmigrar a Australia (Alvarez Rojas *et al.*, 2016; Shima *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2019).

1.5.4. Epidemiología molecular en África

La EQ es considerada una de las enfermedades zoonóticas más importantes que afecta a los países del continente africano. La información sobre la epidemiología molecular de *E. granulosus* sensu lato es escasa en los hospedadores salvajes de África.

La especie *E. granulosus* sensu stricto (G1-G3) está distribuida por todo África excepto en las regiones del norte árido. La transmisión del parásito se mantiene tanto por un ciclo de vida doméstico como silvestre. Se han descrito infecciones con *E. granulosus* sensu stricto en humanos y en una amplia gama de especies de ganado doméstico que actúan como HI (búfalos, ovejas, vacas, cabras, equinos, búfalos, cerdos, dromedarios). También se han descrito infecciones en lobos dorados, zorros rojos, leones y hienas manchadas que actúan como HD salvajes. En Túnez se han descrito infecciones mixtas en

un mismo hospedador: una persona infectada con G1 y G6, y un burro infectado con G1 y G4 (Oudni-M'rad *et al.*, 2016; Deplazes *et al.*, 2017).

Recientemente, Wassermann *et al.* (2015) describieron un ciclo de vida salvaje de *E. equinus* G4 que involucraba como HD a leones, chacales de lomo negro y como HI a cebras en Namibia (Wassermann *et al.*, 2015). También, se describieron equinos infectados con *E. equinus* G4 en Egipto (Boufana *et al.*, 2014).

Echinococcus ortleppi parece tener una incidencia esporádica en el ganado, como caprinos, porcinos y bovinos (Omer *et al.*, 2010; Addy *et al.*, 2012). Se han descrito infecciones con *E. ortleppi* G5 en camellos de Egipto, un caso en una cebra y un humano de Namibia (Obwaller *et al.*, 2004; Mogoye *et al.*, 2013; Amer *et al.*, 2015).

Echinococcus canadensis G6 predomina en la región del norte de África, donde la EQ parece ser frecuente en camellos pero moderadamente frecuente a rara en otras especies de ganado (vacas, ovejas, cabras), mientras que los casos en humanos son generalizados en números moderados a bajos (Abdel Aaty *et al.*, 2012). La única información molecular perteneciente al área del oeste y centro de África corresponde a un paciente infectado con *E. canadensis* G6 de Ghana (Schneider *et al.*, 2010). *Echinococcus canadensis* G7 fue descrito en cerdos y en humanos de Egipto, Etiopía, Kenia y Sudáfrica (Mogoye *et al.*, 2013).

Echinococcus felidis se encuentra distribuida en el este (en las áreas de conservación de Kenia y Uganda) y sur de África, pero se encuentra restringida a un ciclo de vida salvaje entre leones, hienas y jabalíes. Hasta la fecha, no hay indicios de infecciones en animales domésticos ni en humanos (Wassermann *et al.*, 2016).

1.5.5. Epidemiología molecular en América

La EQ en humanos y HI en América del norte es causada por los genotipos de *E. granulosus* sensu stricto asociado al ganado (ovinos, porcinos y bovinos) y los genotipos de *E. canadensis* (principalmente cérvidos) asociados a la vida salvaje. Se han descrito casos aislados de infecciones con *E. granulosus* sensu stricto G1 en cerdos y con *E. ortleppi* G5 en un humano de México. *Echinococcus canadensis* G7 se mantiene en América del norte

debido a que los perros actúan como HD y los cerdos como HI (Maravilla *et al.*, 2004; Villalobos *et al.*, 2007). *Echinococcus canadensis* G8 y G10 tienen la mayor distribución geográfica y prevalecen en Alaska, Canadá y el norte de Estados Unidos. En el ciclo de estos genotipos los lobos actúan como HD y los renos, alces y ciervos actúan como HI. Además, se describió un solo caso de una persona infectada con *E. canadensis* G8 (McManus *et al.*, 2002; Deplazes *et al.*, 2017).

En América del Sur, la EQ ocurre con alta prevalencia en algunas regiones de Perú (montañas del sur y central), Brasil (sur), Bolivia (suroeste), Chile (regiones del valle central, sur y extremo sur), Uruguay y Argentina (costa, región pampeana y la Patagonia). La enfermedad tiene gran importancia para la salud humana y socioeconómica y presenta alta prevalencia en ganado (Figuras 8 y 9). En Ecuador la prevalencia de la EQ baja en comparación con los países vecinos (Deplazes *et al.*, 2017; Ramos-Sarmiento & Chiluisa-Utreras, 2019).

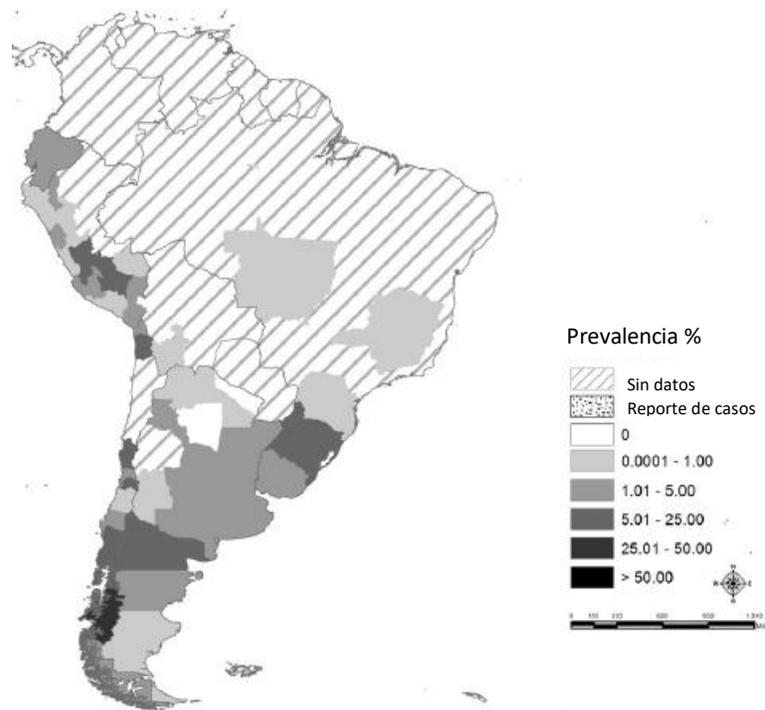


Figura 8. Distribución actual de *Echinococcus granulosus* sensu lato en hospedadores intermediarios domésticos (ovinos, bovinos y porcinos) de América del Sur. Fuente: adaptación de Deplazes *et al.*, 2017.

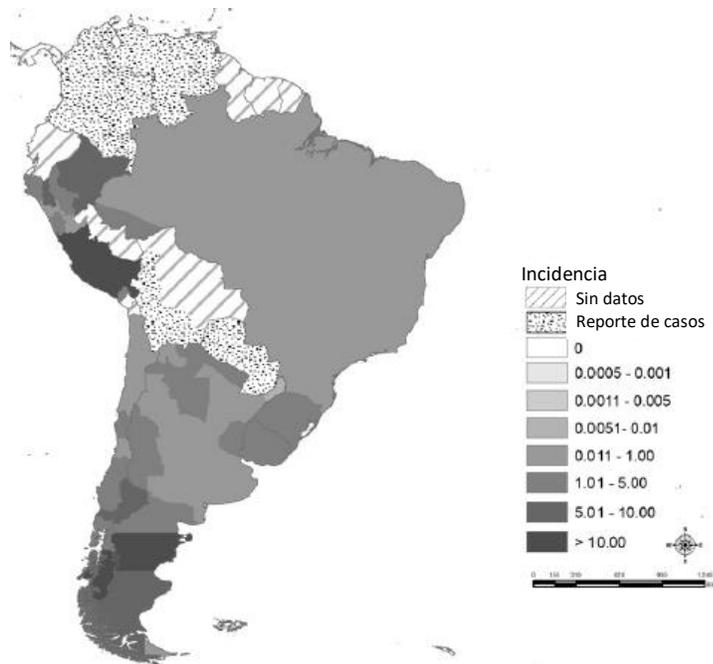


Figura 9. Incidencia actual de echinococcosis quística en humanos de América del Sur.

Fuente: adaptación de Deplazes *et al.*, 2017.

En América del Sur, la EQ se mantiene por ciclos de transmisión doméstica que involucra perros como HD y ungulados (ovejas, cerdos, vacas, cabras, caballos y camélidos) como HI y múltiples especies/genotipos incluyendo *E. granulosus* sensu stricto (G1-G3), *E. ortleppi* (G5) y *E. canadensis* (G6 y G7). La EQ humana está asociada con *E. granulosus* sensu stricto (G1-G3) en Argentina, Brasil, Chile, Perú y Bolivia; *E. ortleppi* (G5) en Argentina y Brasil; y *E. canadensis* G6 en Argentina, Chile y Perú (Cucher *et al.*, 2016).

En el sur de Brasil, *E. granulosus* sensu stricto presenta una distribución simpátrica con *E. ortleppi* y con *E. canadensis* G7. Se describió un solo caso de una persona infectada con *E. ortleppi* en Brasil (de la Rue *et al.*, 2006, 2011; Balbinotti *et al.*, 2012). En Chile, se describió un solo caso de un humano infectado con *E. canadensis* G6, mientras que el resto de los quistes humanos correspondieron a *E. granulosus* sensu stricto G1. Estudios recientes describieron la presencia de *E. granulosus* sensu stricto G1, G3 y *E. ortleppi* G5 en bovinos (Manterola *et al.*, 2008; Espinoza *et al.*, 2014; Alvarez Rojas *et al.*, 2017; Corrêa *et al.*, 2018). Perú tiene la mayor incidencia en América del Sur reportada entre 2009-2014, a pesar de la sub-notificación (Cabrera, 2007; Pavletic *et al.*, 2017). En Perú, *E. granulosus* sensu stricto

G1 es responsable de la mayoría de las infecciones en animales y humanos; sin embargo, se describieron algunos casos de *E. canadensis* G6 y G7 en humanos y en cerdos, respectivamente (Santivanez *et al.*, 2008; Moro *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2012; Yanagida *et al.*, 2012). La información sobre la biología molecular de Uruguay es escasa, limitándose a unas pocas muestras de bovinos infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. ortleppi* G5 (Kamenetzky *et al.*, 2002; Cucher *et al.*, 2016). La información molecular en Bolivia se limita a una sola muestra de una persona infectada con *E. granulosus* sensu stricto G1 (Kamenetzky *et al.*, 2002).

La epidemiología molecular de Argentina se describe en el ítem 1.6.

1.6. Echinococcosis quística en Argentina

En Argentina, el área endémica de EQ cubre el 30,0% del territorio nacional, lo cual corresponde a 1.211.912 km². La superficie comprometida no es uniforme a lo largo del territorio nacional existiendo provincias afectadas en toda su extensión y otras en forma parcial (Guarnera, 2009). Se identificaron tres áreas endémicas donde la incidencia es alta, como el área Patagónica (las provincias de Neuquén y Chubut presentan las tasas más altas del país), el área noroeste (incluyendo las provincias de Catamarca, Santiago del Estero y Salta), la provincia de Entre Ríos en el este (Figura 10) (Pavletic *et al.*, 2017).

En Argentina, entre el año 2005 y 2010, la incidencia anual promedio (IAP) fue 0,95/100.000 habitantes, con la mayor incidencia en Chubut (12,75/100.000), seguido por Neuquén (8,14/100.000) y Santa Cruz (6,41/100.000) (Moral, 2010). En un relevamiento de EQ por ecografía realizado en la provincia de Tierra del Fuego durante 1997-2006, no se detectaron casos en niños menores a 17 años, evidenciando que no hay transmisión de la enfermedad a los humanos en el pasado reciente (Zanini *et al.*, 2009). Bingham *et al.* (2014) realizaron un catastro ecográfico en 560 personas de Ingeniero Jacobacci (Río Negro) en 2009 y encontraron que el 1,6% (3/189) de los niños y el 10,0% (37/371) de los adultos presentaban QH. A pesar de que la EQ es una enfermedad de notificación obligatoria en el país, la sub-notificación de casos es un hecho extensamente reportado (Pavletic *et al.*, 2017).

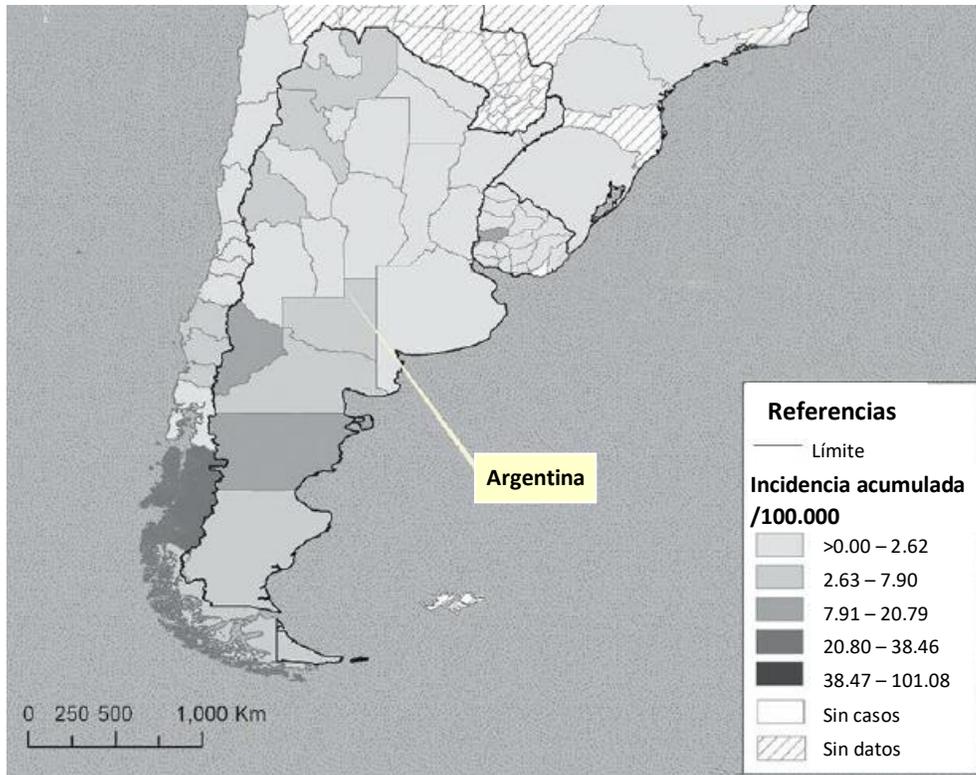


Figura 10. Mapa de la incidencia de echinococcosis quística humana acumulada en Argentina y Cono Sur, en el período 2009 – 2014. Fuente: adaptación de Pavletic *et al.*, 2017.

La EQ es la zoonosis de mayor prevalencia y la que mayor número de muertes produce cada año en Argentina. El índice de letalidad medio (n° de muertes por EQ/ n° de pacientes con cirugía por EQ) fue de 2,7% en Argentina, durante el periodo 2009-2013. Además, la proporción de casos en niños menores a 15 años de edad fue del 15,8%, indicando una transmisión activa de la enfermedad en el país. La EQ fue responsable de un promedio anual de 9,8 días de hospitalización por cada caso en Argentina (Pavletic *et al.*, 2017).

La IAP de EQ en humanos de Argentina en 2018 fue de 0,7/100.000 habitantes. Las provincias con mayor incidencia en Argentina fueron Chubut con 8,7/100.000 habitantes, seguido por Neuquén con 6,18/100.000 habitantes (Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, 2019). *Echinococcus granulosus* sensu stricto G1 fue descrito en humanos de Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz, Catamarca, Santiago del Estero, Tucumán, Entre Ríos y Buenos Aires (Cucher *et al.*, 2016); mientras que *E. granulosus* sensu stricto G2 fue

descrito en humanos de Tucumán (Kamenetzky *et al.*, 2002). *Echinococcus ortleppi* G5 fue descrito en humanos de Tucumán, Catamarca y San Juan (Kamenetzky *et al.*, 2002; Ávila *et al.*, 2017). *Echinococcus canadensis* G6 es responsable de infecciones en humanos de Neuquén, Río Negro, Buenos Aires, Catamarca y San Juan (Kamenetzky *et al.*, 2002; Guarnera *et al.*, 2004; Soriano *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2017). Hasta el momento no se han detectado casos humanos infectados con G3 y G7.

En el año 2011, las inspecciones oficiales de mataderos en Argentina informaron la siguiente prevalencia de EQ a nivel nacional: 3,0% de 916.102 ovejas, 1,6% de 3.273.864 cerdos y 2,9% de 9.010.321 bovinos (Trezeguet *et al.*, 2011). Las provincias más fuertemente infectadas para las ovejas fueron Río Negro (21,9%), Buenos Aires (9,2%) y Chubut (2,2%), mientras que los cerdos infectados se encontraron con mayor frecuencia en La Pampa (2,2%), Mendoza (1,8%), Buenos Aires (1,7%) y Santa Fe (1,1%). El ganado bovino infectado se observó con mayor frecuencia en Río Negro (19,1%), seguido de Neuquén y Misiones (15,0%) (Deplazes *et al.*, 2017). Argentina presenta mayor diversidad genotípica descrita en ganado que cualquier otro país del mundo. *Echinococcus granulosus* sensu stricto G1 fue descrito en ovinos, bovinos, caprinos y porcinos de Tierra del Fuego, Chubut, Río Negro, Neuquén, Buenos Aires, Santa Fé y Tucumán (Soriano *et al.*, 2010; Soriano *et al.*, 2015; Cucher *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017). *Echinococcus ortleppi* G5 fue descrito en bovinos de Catamarca, San Juan y Santa Fe (Kamenetzky *et al.*, 2002; Ávila *et al.*, 2017). *Echinococcus canadensis* G6 fue descrito en bovinos y caprinos de Neuquén y Mendoza, siendo los caprinos el reservorio de G6 (Soriano *et al.*, 2010, 2016). *Echinococcus canadensis* G7 fue descrito en cerdos de Santa Fe, Neuquén, Córdoba y Buenos Aires (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2017).

Aproximadamente, el 2,5% de los perros muestreados de 352 establecimientos de producción de ovinos de La Pampa, Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego fueron positivos en el test de copro-ELISA (Cavagion *et al.*, 2005). En el período 2005-2008, la prevalencia de infección en perros rurales de Neuquén determinada por copro-ELISA fue de 12,4% (Pierangeli *et al.*, 2010). Perros infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1 fueron descritos en Neuquén, Río Negro, Chubut, Buenos Aires y Santa Fe, mientras

que perros infectados con *E. ortleppi* G5 fueron descritos en Catamarca y con *E. canadensis* G6 en Neuquén, Río Negro y Catamarca (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2017). *Echinococcus canadensis* G7 fue descrito en un perro de Neuquén (Kamenetzky *et al.*, 2002).

1.7. Impacto socio-económico de la echinococosis quística

La EQ no sólo causa importantes problemas de salud en los países endémicos, sino que también provoca un importante problema económico por pérdidas de producción asociadas al ganado, costos de implementación y mantenimiento de un programa de control, costos de tratamiento y salarios perdidos (Brunetti *et al.*, 2010).

Las pérdidas económicas asociadas a la EQ en el ganado incluyen costos directos, resultando en pérdida por decomiso de vísceras afectadas, gastos para la destrucción de vísceras y animales muertos. Los costos indirectos incluyen: reducción en la calidad y cantidad de lana (entre 10,0% y 40,0%), carne (entre 5,0% y 20,0%), de leche (entre 7,0% y 10,0%); menor peso de las crías al nacer de madres infectadas; reducción de la fertilidad y producción de fibra (Torgerson *et al.*, 2003; Budke *et al.*, 2006).

Los programas de control regional que se han implementado y recomendado para la EQ suelen ser muy costosos. Los programas, que varían en cada región, se basan principalmente en combinaciones de desparasitación de perros, sacrificio de perros callejeros, vigilancia epidemiológica, programas de educación y vacunación de ovinos y caprinos (Budke *et al.*, 2006).

La EQ humana es una enfermedad crónica grave, invasiva, de larga evolución que produce daño en distintos órganos y tejidos provocando discapacidad, morbilidad y mortalidad. Los costos de la salud humana se dividen típicamente en costos directos e indirectos. Los costos directos están asociados con el diagnóstico y tratamiento de los pacientes. En contraste, los costos indirectos incluyen los costos asociados con los medicamentos de venta libre, la medicina tradicional y el transporte hacia y desde el centro de salud, pérdidas de productividad y salarios atribuibles a la incapacidad para trabajar debido a manifestaciones clínicas o visitas al centro de salud (Kern *et al.*, 2017). En el año

2006 se calculó el costo global de la EQ, las pérdidas económicas anuales asociadas a EQ humana se estimaron en 193 millones de dólares y aumentaron a 764 millones cuando se ajustaron por falta de información en ciertas regiones (Budke *et al.*, 2006).

1.8. Echinococcosis quística en humanos

1.8.1. Patología y clínica

La EQ en humanos puede presentarse de dos modos: 1) hidatidosis primaria, donde los QH se forman a partir de las oncosferas liberadas de los huevos ingeridos por el humano, 2) hidatidosis secundaria: donde los QH se forman a partir de la liberación de PSC viables (que se reproducen asexualmente) o de pequeñas vesículas hijas durante los procedimientos de tratamiento invasivo o después de una ruptura espontánea o inducida por un traumatismo (Pawlowski *et al.*, 2001). Entre el 60-80% de los pacientes con hidatidosis primarias tienen un solo órgano afectado con un único quiste, y entre el 20-40% de los individuos tienen múltiples quistes, a veces con más de un órgano involucrado (Moro & Schantz, 2009). El hígado es el órgano más comúnmente afectado (aproximadamente 65,0% de los casos), seguido por los casos pulmonares (25,0% de los casos). También se han descrito QH en localizaciones poco frecuentes como bazo, riñón, corazón, cerebro, huesos, cavidad abdominal, entre otros. El rol que juegan las especies del parásito en la localización anatómica de los quistes, si es que existe, no está claro. Una revisión sistemática de la literatura de EQ humana indicó que los QH de *E. granulosus* sensu stricto se desarrollaban preferentemente en el hígado (73,4%) y en segundo lugar en los pulmones (19,6%). El genotipo *E. canadensis* G6 se describió principalmente en hígado (54,3%), pulmones (25,7%), cerebro (12,9%) y otros órganos (7,1%). Sin embargo la relación hígado/pulmón para G6 parecería ser menor que G1. El genotipo G7 parece que se desarrolla casi exclusivamente en el hígado (98,6%) (Cucher *et al.*, 2016).

Se estima que el tiempo que tarda en desarrollarse el QH en humanos a partir de la ingestión del huevo es de aproximadamente 10 meses (Pawlowski *et al.*, 2001). Estudios ecográficos han mostrado que los QH pueden crecer entre 1 y 10 mm por año, dependiendo del órgano que infecten. Los QH hepáticos crecen muy lentamente, con más de la mitad de

los quistes que no muestran cambios en el tamaño en 10 años y un tercio que crece menos de 30 mm. El crecimiento medio de los quistes en los casos que se realizó un seguimiento prolongado fue de 7 mm por año (Frider *et al.*, 1999).

Los quistes pueden pasar por diferentes etapas de desarrollo y viabilidad durante su evolución natural. En el año 2003, el Grupo Informal sobre Echinococcosis de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003) propuso una clasificación de los quistes hepáticos de acuerdo a las características observadas en imágenes ecográficas y estandarizaron los QH hepáticos en distintas categorías clínicas. Según la apariencia de la lesión en la imagen ecográfica los QH se clasifican en: 1) activos: estadios CE1 y CE2, que generalmente son quistes fértiles que contienen PSC viables; 2) transicionales: que incluye los estadios CE3a (con las capas endoquísticas desprendidas hacia el interior del quistes) y CE3b (con contenido interno prácticamente sólido y con vesículas hijas, se ha mostrado que son normalmente viables) y 3) inactivos: estadios CE4 y CE5, que son quistes sin actividad biológica o prácticamente nula, parcial o totalmente calcificados (Figura 11) (Hosch *et al.*, 2008; Junghanss, 2008; Kern *et al.*, 2017).

El efecto de variables internas o externas pueden influir en la evolución natural del QH (Rogan *et al.*, 2006). En algunos casos, estadios quísticos transicionales pueden retroceder a estadios anteriores dependiendo de la viabilidad de los tejidos parasitarios dentro del QH, de tal manera que si existen porciones viables de la lámina germinal o PSC, el quiste podría ser capaz de regenerarse. Por otro lado, los quistes inactivos no podrán sufrir una regresión (Figura 12).

Los estadios tempranos de la EQ son asintomáticos y la enfermedad puede permanecer sin síntomas durante años o décadas, dependiendo del tamaño y del sitio de desarrollo del QH (Wen *et al.*, 2019). Los síntomas clínicos de la enfermedad están relacionados con la localización anatómica, la expansión del QH y la presión que ejerce sobre los tejidos adyacentes, induciendo disfunción del órgano afectado o compromiso vascular, pero sin sufrir metástasis. La sintomatología repentina puede deberse a una ruptura espontánea o traumática del quiste (Pawlowski *et al.*, 2001). La sintomatología usualmente aparece cuando el QH alcanza más de 10 cm de diámetro en el hígado o cuando

más del 70% del volumen del órgano es ocupado por el/los QH, resultando en compresión física o daño de los conductos biliares, venas hepáticas, vena portal o la arteria hepática. Diversos síntomas pueden deberse a la compresión o daño de los bronquios pulmonares o a diversas estructuras del cerebro, lo que también puede resultar en complicaciones que ponen en peligro la vida. En cualquier órgano, la compresión de las estructuras vitales puede ser sintomática incluso con QH pequeños o medianos. Existe poca resistencia para el crecimiento del parásito en los pulmones, debido a que existe una presión negativa y una gran elasticidad tisular (Ramos *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2019).

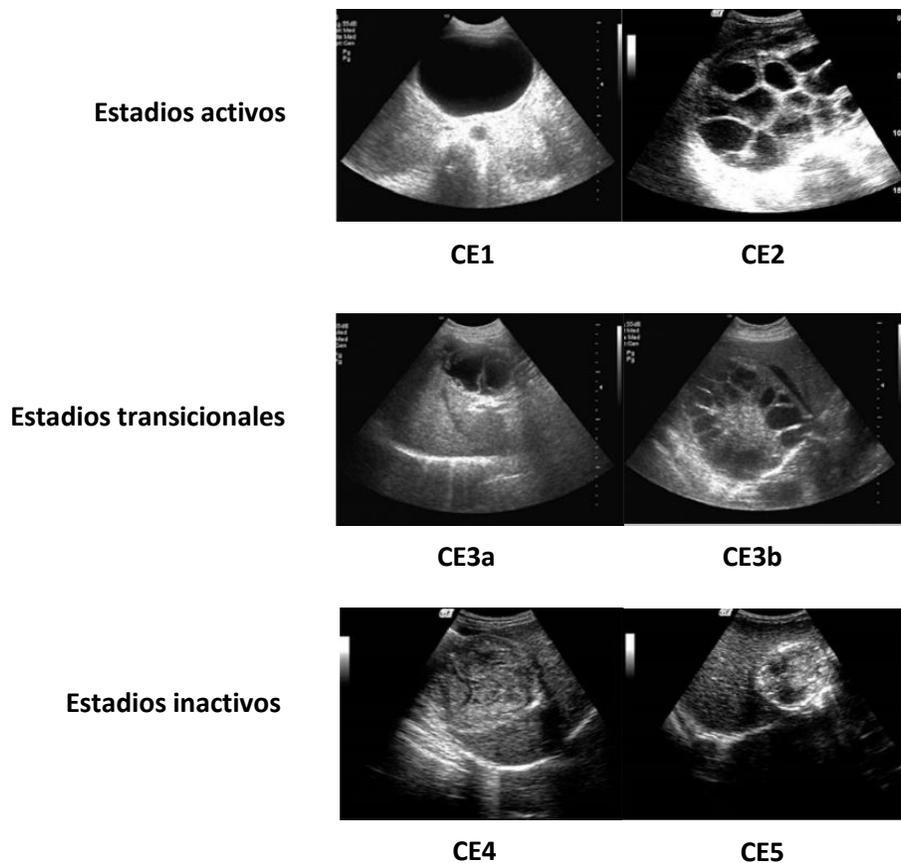


Figura 11. Clasificación de quistes hepáticos según imágenes ecográficas, propuestas por la Organización Mundial de la Salud. (Fuente: WHO-IWGE, 2017).

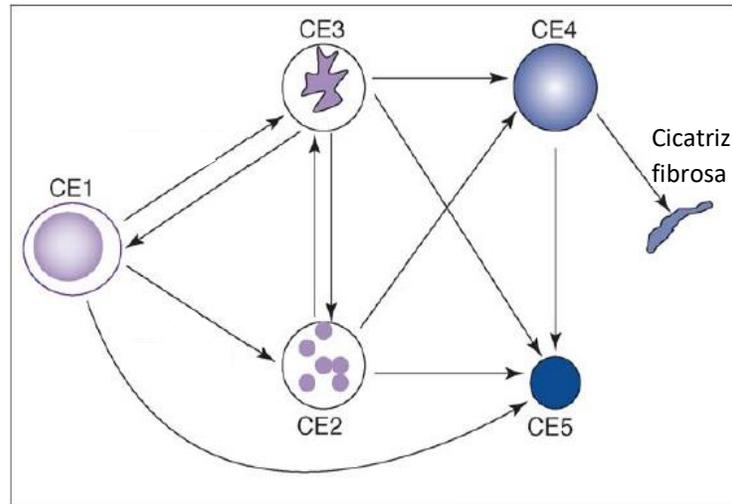


Figura 12. La posible progresión del desarrollo de quistes basado en observaciones a largo plazo. Adaptado de Rogan *et al.* 2006.

Los pacientes sintomáticos con QH hepáticos suelen presentar con mayor frecuencia malestar abdominal superior y falta de apetito; la compresión de los conductos biliares puede conducir a la ictericia colestásica. En la palpación de la zona abdominal se puede encontrar una masa tumoral, hepatomegalia o distensión abdominal. También se puede presentar dolor epigástrico derecho, náuseas, fiebre y vómito (Karavias *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 2019). Dolor en el pecho, tos o hemoptisis pueden ser indicativos de la presencia de QH en el pulmón. La mayoría de los quistes pulmonares se adquieren en la infancia, permanecen asintomáticos durante un largo período de tiempo y luego se diagnostican de forma incidental en la radiografía de tórax. La ruptura del quiste en los bronquios puede producir la eliminación del contenido hidatídico por vómica. En el pulmón los signos y síntomas más comunes son fiebre, tos crónica, hemoptisis, neumotórax, pleuritis, neumonía, abscesos pulmonares y embolismo pulmonar parasítico. En cualquier órgano la fisura y la ruptura del QH puede producir fiebre, urticaria, eosinofilia y hasta un shock anafiláctico fatal (Kern *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2019). Cualquier sintomatología neurológica (signos de hipertensión intracraneal, epilepsia, todo tipo de parálisis, entre otros) pueden presentarse en pacientes con quistes cerebrales. Los síntomas van a depender de la localización del QH en el cerebro y generalmente el desarrollo es lento (Duishanbai *et al.*, 2010).

La mortalidad por EQ se relaciona principalmente con las complicaciones de la enfermedad (abscesos, estenosis, fístulas, rupturas espontáneas de los QH, shock anafiláctico) y con los tratamientos quirúrgicos (ruptura accidental del quiste, hemorragia de la vena cava, hemoperitoneo, embolismo pulmonar, entre otros). En Argentina la tasa de mortalidad específica por EQ (proporción de muertes producidas por EQ en la población) fue 19 personas/100.000 habitantes por año entre 2002-2005. La tasa media de letalidad (proporción de muertes producidas por EQ en función de la cantidad de personas infectadas) fue de 2,7% entre el año 2009-2013 (Guarnera *et al.*, 2009; Pavletic *et al.*, 2017).

Uno de los aspectos que podría verse afectado por la variabilidad genética de *E. granulosus* sensu lato es la presentación clínica (localización, tamaño, estadio, fertilidad, viabilidad). El conocimiento actual sobre los aspectos clínicos de la hidatidosis se basa en reportes que no han tenido en cuenta los diferentes genotipos que infectan a los humanos. Existen pocos estudios en donde se relaciona el genotipo con el que fue infectado el humano y la localización, estadio y/o el tamaño del QH. Existe un solo reporte en 41 humanos de Argentina que relacionaba el genotipo con el que fue infectado el paciente y la localización, estadio, diámetro del QH y la presencia/ausencia de síntomas del paciente (Guarnera *et al.*, 2004). Sin embargo, en este estudio no se tuvieron en cuenta aspectos como la edad, sexo, número de QH del paciente, fertilidad y viabilidad del QH.

1.8.2. Aspectos inmunológicos de la infección por *Echinococcus granulosus* sensu lato en humanos

El parásito *E. granulosus* sensu lato ha desarrollado estrategias sofisticadas para evadir la respuesta inmune del hospedador, principalmente mediante la manipulación y dirección de esta respuesta inmune hacia la anergia y/o la tolerancia. El parásito puede utilizar dos mecanismos para alterar la respuesta inmune del hospedador: 1) el escape pasivo, en el cual el parásito al convertirse en QH evita los efectos dañinos de la respuesta inmune; 2) la inmunomodulación, a través de la cual el parásito interactúa activamente con el sistema inmune del hospedador para reducir el impacto de la respuesta del mismo (Siracusano *et al.*, 2009).

En la infección parasitaria, el hospedador humano utiliza mecanismos inmunes innatos y adquiridos. Durante la enfermedad, la característica diferencial de la relación parásito-hospedador es que la infección crónica coexiste con una respuesta humoral y celular contra el parásito (Siracusano *et al.*, 2012b). La capa laminar del QH, estructura rica en carbohidratos resistentes a la proteólisis, protege a la capa germinal de diversos mecanismos innatos efectores, como la producción de óxido nítrico por los macrófagos y células dendríticas (CeDen) del hospedador, e incluso evita el reconocimiento inmunitario específico protector por las células T circundantes (Díaz *et al.*, 2011a, 2015).

La relación del parásito con el hospedador puede dividirse conceptualmente en dos fases: pre-enquistamiento y post-enquistamiento (Zhang *et al.*, 2003). La formación del QH comienza entre 2 y 4 semanas luego de la ingestión del huevo del parásito por el hospedador. Los factores que pueden influenciar en la susceptibilidad innata y resistencia natural a la infección son la edad, sexo, órgano afectado y otras condiciones fisiológicas del hospedador. La susceptibilidad a la infección también puede ser explicada por la presencia de diferentes especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato.

En la primera fase de infección, entre los 3 y 5 días, aparece una marcada activación de la inmunidad activada por células incluyendo respuesta inflamatoria celular y cambios patológicos. El infiltrado celular por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y fibrocitos ocurre en la infección en humanos. La respuesta temprana de las inmunoglobulinas IgG a los antígenos del LH y de la oncosfera aparecen luego de 2 semanas. Estos anticuerpos contra las oncosferas juegan un papel importante en la eliminación del parásito y son centrales en la respuesta inmune protectora contra *E. granulosus* sensu lato. Aunque los niveles de IgG contra la oncosfera son bajos en la primera fase de infección, los mecanismos para eliminar al parásito involucrarían reacciones de citotoxicidad mediadas por células dependientes de anticuerpos. En la fase crónica de la EQ, hay una frecuente ocurrencia de niveles elevados de anticuerpos que está asociada a la presencia de infiltrado celular importante que incluye macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y fibrocitos (Zhang *et al.*, 2012).

El parásito *E. granulosus* sensu lato induce dos patrones de citoquinas muy distintos y opuestos: las células T helper Th1 y Th2. La respuesta de Th1 beneficia al hospedador,

mientras que la respuesta de Th2 beneficia al parásito. Los linfocitos Th1 producen IL-2, IFN- γ y linfoxina, mientras que los linfocitos Th2 liberan las interleuquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Paradójicamente, en las infecciones por *E. granulosus* sensu lato ambas citoquinas están muy activadas. Los altos niveles de IL-10 e IFN- γ en pacientes con EQ sugiere que la respuesta inmune está regulada por ambos perfiles de citoquinas y podría explicarse por la presencia de una variedad muy amplia de antígenos presentes en el LH, que probablemente tengan epitopes capaces de estimular ambos subtipos de linfocitos T. El desequilibrio de Th1/Th2 juega un papel importante para controlar la inmunopatogénesis. La evolución de la enfermedad hacia la resolución parece estar asociada al predominio de un perfil de tipo Th1, mientras que la supervivencia del parásito por tiempo prolongado se relaciona con un perfil Th2 (Riganò *et al.*, 1999, 2007; Siracusano *et al.*, 2012a; Zhang *et al.*, 2012; Gottstein *et al.*, 2017).

Los antígenos de *E. granulosus* sensu lato influyen en la maduración y diferenciación de las CeDen por la estimulación de lipopolisacáridos. Las CeDen migran a los órganos linfáticos, pierden su capacidad de capturar antígenos y adquieren la capacidad de activar a los linfocitos T, incrementando la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase II, CD80 y CD86. El LH modula la transición de monocitos humanos a CeDen, perjudica la secreción de IL-12, IL-6 o prostaglandina E2 (PGE2) en respuesta a la estimulación por lipopolisacáridos, y modula el fenotipo de las células resultando en un incremento de la expresión de CD14 (Zhang *et al.*, 2012). Riganò *et al.* (2007) demostraron que los metabolitos de *E. granulosus* sensu lato y el antígeno B (AgB) purificado presentaban potencial inmunomodulatorio en las CeDen de humanos. Por lo tanto, *E. granulosus* sensu lato escapa de la inmuno-vigilancia al interferir en la diferenciación de los monocitos y adicionalmente por la maduración de las CeDen.

El desequilibrio funcional de Th17/linfocitos T reguladores (Treg) está presente en pacientes con EQ y juega un papel importante en la inmuno-tolerancia y la progresión de la enfermedad. La constante liberación de algunas moléculas activas por *E. granulosus* sensu lato a la circulación durante el curso de la enfermedad infecciosa puede modular activamente el sistema inmune del hospedador y cambiar el balance Th17/Treg a la

respuesta inmune supresora dominante de Treg, inhibiendo la respuesta inflamatoria inducida por las células Th17 (Tuxun *et al.*, 2012; Gottstein *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017).

Los productos metabólicos del estadio metacestodo de *E. granulosus* *sensu lato* parecen jugar un rol fundamental en la estrategia de supervivencia del parásito. El LH constituye la fuente más importante de antígenos de este estadio, ya que los PSC secretan proteínas antigénicas. De la gran variedad de proteínas aisladas y caracterizadas del LH, estudiadas para el desarrollo de diagnóstico serológico, los principales antígenos inmunogénicos son el antígeno 5 (Ag5) y el AgB (Riganò *et al.*, 2007).

El Ag5 es una glicoproteína termolábil de aproximadamente 400 kDa que en condiciones reductoras se disocia en dos subunidades, una de 38 kDa y otra de 22 kDa (Lightowlers *et al.*, 1989). La función biológica de este antígeno no se conoce completamente, aunque se relaciona con el desarrollo del metacestodo y con el contacto entre la superficie celular y la matriz extracelular (Lorenzo *et al.*, 2003). El Ag5 fue ampliamente utilizado para detectar en humanos la presencia de anticuerpos precipitantes por técnicas de inmunodifusión (arco 5), sin embargo presenta baja sensibilidad y reacción cruzada con anticuerpos humanos contra otros parásitos del género *Echinococcus*.

El AgB es una lipoproteína termoestable fuertemente inmunogénica de 120-160 kDa, compuesta por subunidades de 8 kDa. Bajo condiciones de reducción en SDS-PAGE, se disocia en subunidades de 8-12, 16 y 20-24 kDa. La subunidad de 8 kDa es la que presenta mejor desempeño en el diagnóstico de la EQ y ha sido utilizada ampliamente en formas sintéticas, recombinantes o nativas en diferentes tests serológicos (Savardashtaki *et al.*, 2019). Este antígeno juega un papel fundamental en los mecanismos inmunomodulatorios que utiliza el parásito para crecer, progresar y causar la enfermedad crónica (Siracusano *et al.*, 2012a, b; Silva-Álvarez *et al.*, 2016). Se ha descrito como un inhibidor de proteasas y presenta la habilidad de inhibir la quimiotaxis de neutrófilos humanos. También promueve una respuesta no protectora tipo Th2 e induce apoptosis en células inmunes en pacientes con EQ activa (Sheperd *et al.*, 1991; Riganò *et al.*, 2001). El AgB actuaría como un antígeno de interferencia permitiendo la liberación de PSC para desarrollar quistes secundarios (Virginio *et al.*, 2007). Este antígeno también tiene un papel en mecanismos de

detoxificación de lípidos, lo que podría asociarse con la supervivencia del parásito (Chemale *et al.*, 2005). El AgB está codificado por una familia de multigenes presentando hasta el momento cinco isoformas distintas (AgB1-AgB5) que presentan expresión variable y se agrupan en dos grupos: EgAgB1/B3/B5 y EgAgB2/B4 (Fernández *et al.*, 1996; Chemale *et al.*, 2001). Estas cinco subunidades difieren entre sí en su secuencia de aminoácidos entre un 44% a 81% y el cambio de expresión de una isoforma a la otra permitiría al parásito evadir la respuesta inmune y modular las reacciones inflamatorias que rodean al QH. Los miembros de la familia de genes de EgAgB se expresan de manera diferencial en los distintos estadios de *E. granulosus* sensu lato, incluyendo adultos maduros, inmaduros y oncosferas, así como también en distintos componentes de un mismo estadio, como la capa germinal y los PSC del metacestodo (Zhang *et al.*, 2010). Además, se demostró que existe variación en la expresión de la secuencia de un mismo antígeno en diferentes genotipos de *E. granulosus* sensu lato. Por ejemplo, se ha demostrado que el AgB2 se expresa en los genotipos G1/G2, pero no en los genotipos G5 y G6/7 (Haag *et al.*, 2004, 2006; Kamenetzky *et al.*, 2005; Muzulin *et al.*, 2008; Boubaker *et al.*, 2014). Las diferencias de expresión de un determinado antígeno de acuerdo al genotipo podrían afectar los resultados de las pruebas serológicas, por lo tanto es importante conocer el perfil antigénico de LH de diferentes genotipos.

En general, en las pruebas serológicas los antígenos nativos, tanto crudos como purificados, dan lugar a resultados extremadamente variables. Esta variabilidad está determinada, entre otros, por la dificultad de estandarización, ya que los antígenos deben ser obtenidos de infecciones naturales y cada lote tendrá una composición diferente. Esta variabilidad también puede ser atribuida en el caso de antígenos purificados a la falta de un consenso en cuanto a los métodos de purificación de determinados antígenos. Con el fin de solucionar los problemas de estandarización antigénica, se han desarrollado antígenos recombinantes, que buscan mejorar la especificidad y la reproducibilidad en el diagnóstico serológico. Además, otra de las causas de los resultados dispares en las pruebas serológicas es la variabilidad antigénica que presenta el AgB. Anteriormente, se ha demostrado que el EgAgB2 recombinante tiene un valor diagnóstico más alto en comparación con el EgAgB1

recombinante o AgB nativo para el diagnóstico serológico de EQ en humanos (Lorenzo *et al.*, 2005; Sarkari *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2011; Rahimi *et al.*, 2011; Folle *et al.*, 2017).

Hasta el momento, la caracterización antigénica del LH de *E. granulosus* sensu lato ha sido estudiada principalmente en ovinos. En esos estudios la evaluación de la composición antigénica fue realizada teniendo en cuenta el HI y, en solo algunos trabajos, la localización y el genotipo de los QH. Además, el perfil antigénico fue obtenido mediante inmunoblot (IB) enfrentando las bandas de proteínas del LH con sueros humanos con hidatidosis confirmada, sin tener en cuenta el genotipo de *E. granulosus* sensu lato con el cual estaban infectados estos pacientes. El conocimiento del perfil antigénico, teniendo en cuenta todas las variables mencionadas, sería de utilidad para la aplicación en la realización de pruebas diagnósticas, con el objetivo de diagnosticar adecuadamente HI (fundamentalmente en ganado ovino, bovino, caprino y porcino) y humanos infectados con diferentes especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato.

1.8.3. Diagnóstico y seguimiento de la Echinococcosis quística

El diagnóstico de EQ en humanos se basa en los datos epidemiológicos y clínicos, en la identificación de estructuras del quiste mediante el uso de técnicas por imagen (radiología, ecografía, tomografía computada, resonancia magnética), en técnicas inmunológicas y/o anatomía patológica (Pawlowski *et al.*, 2001; Brunetti *et al.*, 2009).

1.8.3.1. Técnicas de imagen

Los estudios por imágenes son el primer paso en el diagnóstico de EQ y son fundamentales para determinar la localización, el tamaño y el estadio del QH, así como identificación de posibles complicaciones y monitoreo de la respuesta al tratamiento (Kern *et al.*, 2017).

La ecografía se convirtió en la técnica por imagen más empleada para la detección del QH en el hígado y cavidad abdominal, que son las localizaciones más frecuentes (Moro & Schantz, 2009). Es una técnica no invasiva capaz de detectar QH en etapas relativamente tempranas, es de bajo costo y permite el diagnóstico y la evaluación de las complicaciones

de los quistes con gran eficiencia (Eckert & Deplazes, 2004). Actualmente es una técnica disponible en cualquier centro de salud de países en vías de desarrollo y tras la introducción de ecógrafos portátiles se ha facilitado mucho su utilización en zonas rurales y de difícil acceso donde otro tipo de técnicas de imagen no se podrían utilizar. Por estos motivos, la ecografía se utiliza para realizar catastros escolares y/o poblacionales. Argentina ha sido uno de los primeros países en América del Sur en implementar estudios ecográficos en la población como una herramienta para el diagnóstico de EQ y también para evaluar el éxito de los programas de control (Del Carpio *et al.*, 2012; Bingham *et al.*, 2014).

El diagnóstico de la EQ mediante ecografía presenta ciertas desventajas, como por ejemplo su inaplicabilidad para la detección de quistes en otras localizaciones distintas al abdomen (Frider y Larrieu, 2010; Tamarozzi *et al.*, 2017). Por lo tanto, la OMS recomienda el uso de una segunda prueba diagnóstica, por ejemplo una basada en la detección de anticuerpos séricos contra el parásito, para la confirmación de los hallazgos por técnicas de imagen en la hidatidosis. No sólo se recomienda en estos casos dudosos, sino también para confirmar aquellos en los que la evidencia diagnóstica sea mayor (WHO, 2003).

1.8.3.2. Técnicas inmunodiagnósticas

Además de la utilidad en la confirmación de los hallazgos por técnicas de imágenes, las técnicas inmunológicas serían potencialmente útiles para la monitorización y el seguimiento de pacientes, y para estudios epidemiológicos (Carmena *et al.*, 2007).

El inmunodiagnóstico de la EQ puede ser directo, mediante técnicas que buscan antígenos específicos del parásito, o bien indirecto, mediante la detección de anticuerpos específicos contra el parásito. Así mismo, se pueden buscar otras moléculas relacionadas, como citocinas, aunque estas son más frecuentemente utilizadas para el seguimiento de la enfermedad (Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

La detección de antígenos podría ser ventajosa en comparación con la detección de anticuerpos en etapas tempranas de la infección y para el seguimiento de los pacientes tratados, ya que la disminución de los antígenos circulantes ocurre antes de la disminución de anticuerpos en pacientes curados. Los ensayos de detección de antígenos dependen

principalmente de la unión de anticuerpos policlonales o monoclonales específicos al antígeno del parásito presente en el suero, orina o saliva. La utilización de anticuerpos monoclonales es poco frecuente, por lo que es usual encontrar reactividad cruzada con otros parásitos (Zhang *et al.*, 2012; Siles-Lucas *et al.*, 2017a). Generalmente los tests para la detección de antígenos presentan baja sensibilidad, por lo que su aplicación en la práctica clínica es limitada (Zhang & McManus, 2006). El elevado número de falsos negativos se debe a la estructura parasitaria que impide la salida de niveles apreciables de antígenos y también a la formación de complejos antígeno-anticuerpo que secuestran los antígenos circulantes e impiden su detección (Craig & Nelson, 1984; Sadjjadi *et al.*, 2009).

Los QH producidos por *E. granulosus* sensu lato inducen una fuerte respuesta de anticuerpos en la mayoría de los pacientes, desencadenando diferentes isotipos (IgG, IgM, IgA e IgE), aunque la intensidad y la especificidad de la respuesta dependen de varios factores. Los principales métodos serológicos utilizados para el diagnóstico y seguimiento de la EQ en humanos se basan en la detección de anticuerpos IgG específicos. El LH es el antígeno más utilizado para la detección de anticuerpos IgG. Esta mezcla de antígenos es actualmente utilizada en varias técnicas como el ELISA, la hemoaglutinación indirecta (HAI) y el IB. Tanto el ELISA como el HAI son las técnicas más utilizadas en el diagnóstico de EQ en humanos, mientras que el IB se utiliza como test confirmatorio. La técnica de doble difusión Arco 5, utilizada años atrás, hoy en día se usa raramente debido a que presenta baja sensibilidad. Entre los diferentes tests se han detectado diferencias considerables en cuanto a la sensibilidad y especificidad, que suelen ser bajas, y un valor de pronóstico deficiente para el seguimiento debido a la persistencia de los anticuerpos contra el LH luego de haber sido extraído el QH (Barnes *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

Distintos estudios de diagnóstico para EQ que utilizaron ELISA-IgG contra los antígenos del LH reportaron una sensibilidad en un rango que varió de 64,8% a 100,0%. Los resultados de falsos negativos podrían depender de diversos factores como el genotipo, estadio y localización del QH, QH simples y pequeños y la variabilidad antigénica del LH. Además, se han descrito elevados porcentajes de resultados falsos positivos en ELISA-IgG que utilizan LH como antígeno en pacientes de diferentes áreas geográficas. También se ha

descripto reacción cruzada de los anticuerpos contra el LH en pacientes con otras enfermedades parasitarias (principalmente echinococcosis alveolar y cisticercosis) y no parasitarias (Hernández-González *et al.*, 2012; Manzano-Román *et al.*, 2015; Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

Distintos tipos de antígenos se han evaluado para ser utilizados en tests serológicos, como extractos somáticos de PSC, antígenos nativos purificados y recombinantes (fundamentalmente de diferentes subunidades de AgB y Ag5), aumentando estos últimos el nivel diagnóstico. Sin embargo, los resultados falsos negativos se deben a factores similares reportados para el LH y su desempeño nunca ha sido evaluado a gran escala, y ninguno de los antígenos reportados es lo suficientemente sensible o específico para ser usado como una primer herramienta para el diagnóstico o catastros poblacionales (Chamekh *et al.*, 1990; Carmena *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Manzano-Román *et al.*, 2015; Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

Varios kits basados principalmente en ELISA, HAI e inmunocromatografía, que contienen LH crudo o fracciones semipurificadas de esta mezcla antigénica, están disponibles comercialmente. Los resultados de validación y comparación con las herramientas “gold standard” se han publicado solo para algunos de ellos. Diversos kits de ELISA comercial fueron evaluados y comparados con ELISAs “in house”, presentando variables resultados falsos negativos y falsos positivos para los kits comerciales (Liance *et al.*, 2000; Auer *et al.*, 2009). El test de HAI fue evaluado por diferentes autores presentando resultados variables en la sensibilidad (de 34,9% a 88,0%) y especificidad (por ejemplo de 44,0% a 70,0% en pacientes con echinococcosis alveolar) (Liance *et al.*, 2000; Auer *et al.*, 2009).

En los últimos años, se han desarrollado herramientas de diagnóstico sensibles y fáciles de usar. Éstas se basan principalmente en tests inmunocromatográficos rápidos (TIR), algunos de los cuales son comercializados. La sensibilidad del TIR depende del antígeno utilizado y del estadio del QH. Tamarozzi *et al.* (2016) compararon tres TIR, basados en distintos tipos de antígenos, y un ELISA IgG comerciales y observaron que la sensibilidad (57,0% a 74,0%) y especificidad (72,0% a 100,0%) no presentaron diferencias

con el test de ELISA. Tanto los tests de ELISA más sensibles como los TIR, que contienen LH o fracciones purificadas de este antígeno, podrían ser usados como una herramienta de diagnóstico primaria para la EQ.

Hasta el momento, los estudios realizados para evaluar el rendimiento de distintas pruebas serológicas han utilizado sueros de pacientes con hidatidosis confirmada teniendo en cuenta ciertas variables que podrían afectar el sensibilidad de los tests, como la localización (fundamentalmente hepática y pulmonar), número de QH y estadio de los QH hepáticos. Sin embargo, no se ha evaluado el rendimiento de las pruebas serológicas en función del genotipo del QH teniendo en cuenta que las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato presentan diferencias antigénicas y, por lo tanto, podrían afectar los resultados de estas pruebas.

1.8.3.3. Técnicas de detección histológica del parásito

La presencia de un quiste producido por *E. granulosus* sensu lato puede confirmarse mediante un examen directo de biopsia y de aspirado del contenido del QH. Generalmente este examen se basa en la coloración de las capas y/o del contenido del QH y posterior observación directa al microscopio, para determinar la presencia de ganchos rostelares y PSC (Brunetti *et al.*, 2010).

1.8.4. Tratamiento

El tipo de tratamiento de la EQ se decide fundamentalmente dependiendo de la localización del QH. En el caso de los QH hepáticos, la clasificación ultrasonográfica de la OMS y la presencia y/o tipo de complicaciones influyen en la decisión terapéutica (WHO, 2017) (Figura 13). Para pacientes con QH hepáticos y/o abdominales sin complicaciones las alternativas de tratamiento propuestas son: cirugía, drenaje percutáneo, tratamiento farmacológico con benzimidazoles y “watch and wait” (observar y esperar). Actualmente las recomendaciones para el manejo de la EQ promueven un enfoque multidisciplinario, con consultas del equipo interdisciplinario para decisiones terapéuticas, la combinación de tratamientos quirúrgicos y farmacológicos, un seguimiento a largo plazo de los pacientes,

el establecimiento de recomendaciones internacionales y la creación de centros de referencia (Brunetti *et al.*, 2010).

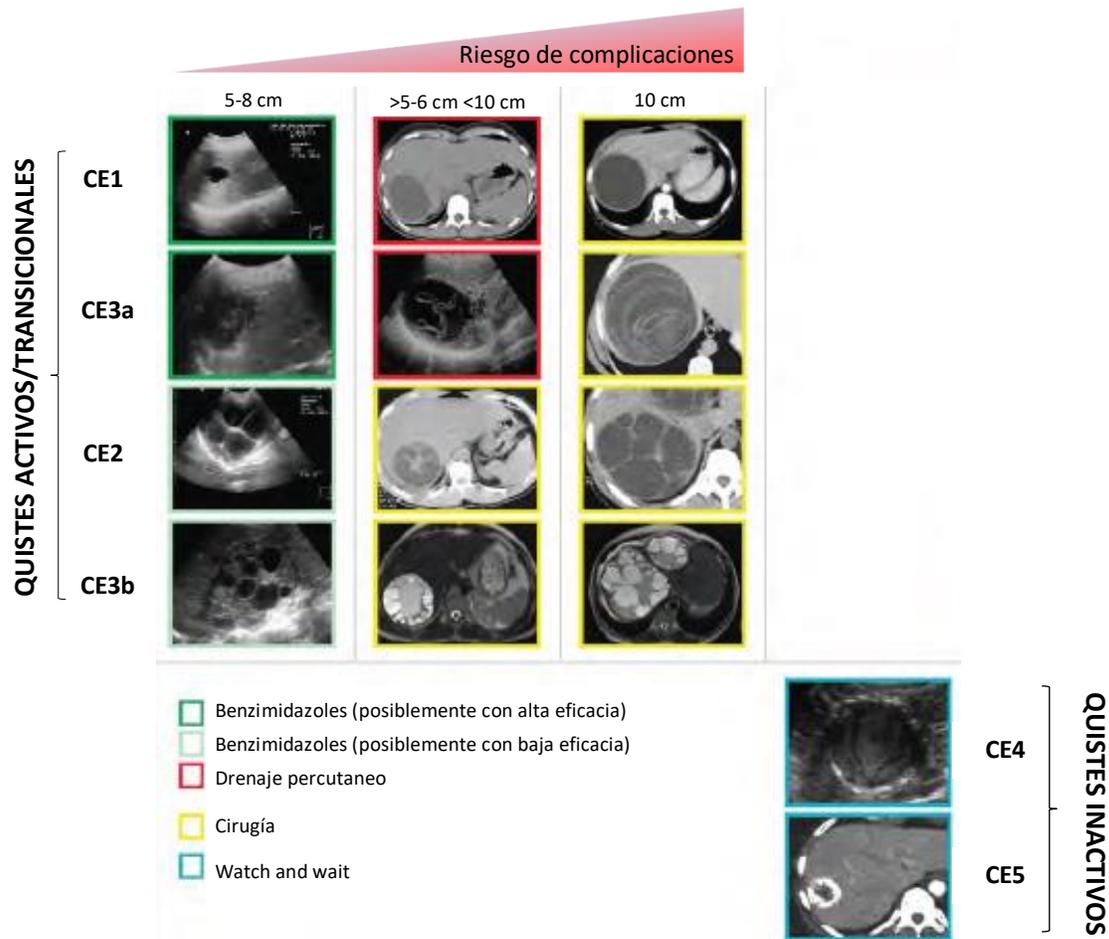


Figura 13. Asignación de las modalidades de tratamiento a las etapas individuales de los quistes hidatídicos y los riesgos de complicaciones por estadio y tamaño del quiste. Adaptado de WHO (2017).

1.8.4.1. Cirugía

El objetivo de la cirugía en el tratamiento de la EQ es la remoción del QH. Este tratamiento es elegido para QH complicados tales como quistes con posibilidad de ruptura, con infección bacteriana, comunicados con la vía biliar o que estén ejerciendo presión en órganos vitales adyacentes. También es indicado para aquellos quistes activos CE2 y transicional CE3b medianos, con múltiples vesículas hijas, y en todos los QH grandes (>10 cm) excepto los quistes inactivos (CE4 y CE5). La cirugía no se recomienda para el

tratamiento de quistes asintomáticos inactivos, quistes de difícil acceso o quistes muy pequeños (Junghanss *et al.*, 2008; Brunetti *et al.*, 2010).

Para minimizar el riesgo de hidatidosis secundaria por vertido de PSC, actualmente se recomienda el uso de una solución hipertónica salina al 20,0% en contacto con la capa germinal por al menos 15 minutos antes de la remoción del QH. Se aconseja también un tratamiento preoperatorio con albendazol (ABZ) empezando al menos una semana antes de la cirugía y continuado dos meses tras la intervención quirúrgica (Junghanss *et al.*, 2008; Brunetti *et al.*, 2010; WHO, 2017).

1.8.4.2. *Drenaje percutáneo*

La inactivación del parásito se logra mediante la esterilización del contenido del QH utilizando una solución escolicida inyectada en la cavidad del quiste (Tamarozzi *et al.*, 2014). Después de la inyección, se eliminan los contenidos líquidos del quiste junto con las capas del parásito. Estas intervenciones se realizan por drenaje percutáneo, que implica técnicas mínimamente invasivas con menor riesgo que la cirugía. Además, el costo de este tratamiento suele ser más bajo que el tratamiento quirúrgico (Brunetti *et al.*, 2010).

Los agentes escolicidas más utilizados para la inyección intraquística en los tratamientos percutáneos son las soluciones salinas hipertónicas (30%) y el alcohol (95%). Es obligatoria la profilaxis con ABZ cuatro horas antes y durante un mes después de la intervención (Brunetti *et al.*, 2010).

1.8.4.3. *Tratamiento farmacológico con benzimidazoles*

Los benzimidazoles metilcarbamatos son los antihelmínticos más utilizados debido a su amplio espectro, su baja toxicidad y su elevada potencia (Hemphill & Müller, 2009). Estos fármacos causan la degeneración selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos en células intestinales y tegumentales del parásito. El metabolito de estos fármacos se une a la subunidad β -tubulina de los microtúbulos del parásito, inhibiendo la polimerización de los microtúbulos, lo que provoca alteraciones degenerativas en las células del tegumento del parásito. También causan un deterioro en la utilización de la glucosa y la secreción de

colinesterasa, que conduce a la inmovilización y la muerte eventual del parásito (Dehkordi *et al.*, 2019). Estos compuestos son potencialmente capaces de matar el metacestodo y por lo tanto de curar a los pacientes con quistes activos. Sin embargo, la eficacia de los benzimidazoles depende del tamaño y tipo de QH, la edad del pacientes (estos fármacos actúan mejor en pacientes más jóvenes que en pacientes de edad más avanzada), y el órgano afectado (Hemphill *et al.*, 2010).

Actualmente, el ABZ es el fármaco de elección para el tratamiento de la EQ, ya que su biodisponibilidad (aunque pobre) es mejor que la de otros fármacos utilizados. La duración del tratamiento depende de la situación del individuo, estadio y tamaño del QH, y los pacientes deben ser monitoreados con imágenes. Actualmente, se recomienda la administración continua del fármaco, evitando las interrupciones de tratamiento mensual recomendadas anteriormente en 1980 (Brunetti *et al.*, 2010). La duración del tratamiento juega un papel crucial, ya que la administración prolongada de medicamentos produce los resultados más favorables para los pacientes (Hemphill *et al.*, 2010).

La quimioterapia con ABZ se recomienda para los QH hepáticos activos CE1 y CE3a menores a 6 cm de diámetro. Los QH CE2 y CE3b con vesículas hijas en su interior y paredes más gruesas responden pobremente al tratamiento y tienen alto índice de “regeneración” (Li *et al.*, 2011; WHO, 2017). El tratamiento con ABZ también está indicado para pacientes inoperables, en pacientes con quistes múltiples en dos o más órganos y en casos con quistes peritoneales (Brunetti *et al.*, 2010). El ABZ está contraindicado para QH grandes y con riesgo de ruptura (situados superficialmente o infectados) y no es necesaria para quistes inactivos CE4 y CE5 (Junghanss *et al.*, 2008).

El tratamiento con ABZ se utiliza en pacientes con quistes pulmonares complicados o que se consideran candidatos quirúrgicos deficientes, incluidos aquellos con quistes no quirúrgicos y múltiples. El uso de ABZ solo ha demostrado una buena eficacia en los QH pulmonares pequeños y sin complicaciones. Sin embargo, el ABZ debe ser evitado antes de la operación para los quistes pulmonares más grandes, ya que la terapia farmacológica puede promover la ruptura debido a cambios degenerativos en la pared del quiste (Kern *et al.*, 2017).

1.8.4.4. “*Watch and wait*” (observar y esperar)

Este tratamiento sigue la evolución del QH por técnicas de imagen en pacientes a los que no se les aplica ningún tipo de tratamiento (Brunetti & Junghanss, 2009). Esta es una opción para los quistes inactivos sin complicaciones, incluidos la mayoría de los quistes CE4 y todos los quistes CE5. Estos tipos de quistes parecen mantener un tamaño estable o degenerarse con el tiempo y no comprometen las funciones de los órganos ni causan molestias al paciente (Junghanss *et al.*, 2008).

1.9. Situación de la Echinococcosis quística en Neuquén

Como se mencionó anteriormente, Neuquén es una de las provincias con mayor incidencia de EQ en Argentina, a pesar de presentar un programa de control desde el año 1970. Un estudio retrospectivo de casos humanos de EQ en la provincia de Neuquén mostró que en el período 1995-2004 la IAP para la población total fue 24,4/100.000 habitantes y 9,7/100.000 habitantes para niños menores de 14 años. Estos valores son muy superiores al de Argentina en el mismo período (1,0/100.000) y las altas tasas en niños indican que existe una transmisión activa de la enfermedad (Pierangeli *et al.*, 2007). En el citado estudio, se observó que la distribución de los casos fue marcadamente heterogénea, con tasas de IAP de hasta 78,4/100.000 habitantes en áreas rurales donde se concentra la actividad ganadera, fundamentalmente la cría de caprinos. Además, se detectaron focos de hiperendemicidad en pequeñas localidades como Pilo Lil (881,0/100.000 habitantes) y El Malleo (231,0/100.000 habitantes). Estos valores son muy superiores a los registrados en la mayoría de los países y sólo comparables a los reportados en Kirguistán y Turkmenistan, donde no se desarrollan programas de control de EQ (Torgerson, 2003; Torgerson *et al.*, 2006; Pierangeli *et al.*, 2007).

En el año 2012, la Subsecretaría de Salud de la provincia de Neuquén publicó la “Guía provincial para manejo de la hidatidosis hepática”. Esta guía se realizó con el objetivo de optimizar recursos en cuanto al diagnóstico, manejo terapéutico interdisciplinario y seguimiento de los pacientes con EQ hepática en la provincia de Neuquén. Se establece que el diagnóstico de EQ hepática se base en la sospecha clínica, datos epidemiológicos y

estudios por imágenes. El pilar fundamental en el diagnóstico es la ecografía, sin embargo ante dudas diagnósticas se recurre a métodos de mayor complejidad como tomografía axial computarizada o resonancia magnética nuclear. No recomienda la serología para la búsqueda de anticuerpos (Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Neuquén, 2012).

Las características de relieve, suelos, lluvia, hidrografía, temperatura y vegetación de la provincia de Neuquén son favorables para el desarrollo del ciclo de *E. granulosus* sensu lato, ya que varían desde la estepa patagónica (árida, con escasas precipitaciones pluviales) al bosque sub-antártico (con clima húmedo y frío, y abundante vegetación).

La principal actividad económica de la población rural es la cría de ganado caprino y en menor medida de ovinos y bovinos para subsistencia. Los datos de producción ganadera de Neuquén según la Dirección Provincial de Estadística y Censos 2015 son: 840.281 caprinos, 206.737 bovinos y 201.899 ovinos. Los últimos datos de producción porcina de Neuquén son del año 2008 con un total de 16.297 cabezas de cerdos (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2008, 2020). El ganado caprino se adapta mejor a las rigurosas condiciones climáticas, edáficas y la escasez de pasturas de Neuquén (Figura 14). La provincia es la segunda productora de caprinos en Argentina, distribuidos mayormente en el norte provincial (departamentos Chos Malal, Minas, Pehuenches y Ñorquín). Las explotaciones de caprinos son de tipo familiar y están a cargo de aproximadamente 2500 pequeños productores, con menos de 2000 cabezas de ganado cada uno. La explotación del ganado caprino es diferente a la realizada en el resto de Argentina. La trashumancia es la modalidad más importante y consiste en el traslado de los animales en dos momentos del año: la veranada y la invernada. La veranada se desarrolla en los valles de altura donde el ambiente brinda pasto y agua al ganado durante el verano y la invernada en la meseta y valles inferiores en donde la escasez de agua y pasturas se hace crítica a fines de la primavera (Figura 15) (Bendini *et al.*, 2004; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2004). El modelo trashumante implica un contacto estrecho entre el hombre, el ganado y el perro (fundamental para el manejo de las majadas o piños). La convivencia entre la familia de crianceros, los caprinos y los perros es permanente, tanto en los procesos de traslado

entre las zonas de veranada e invernada como en las condiciones precarias de alojamiento temporario de verano.



Figura 14. Pastoreo de cabras en el departamento de Minas, Neuquén. Fotografía original, obtenida en el desarrollo del presente trabajo de tesis.



Figura 15. Arreo de animales a la veranada en el departamento Chos Malal, Neuquén. Fotografía tomada por NAN NHHL.

En las áreas urbanas y peri-urbanas la transmisión del parásito se ve favorecida por las malas condiciones sanitarias de los mataderos y la faena ilegal. En estas áreas predomina la cría de cerdos.

La diversidad del ganado susceptible a la infección con *E. granulosus* sensu lato existente en Neuquén podría contribuir a la presencia de ciclos simultáneos del parásito que involucren diferentes HI, lo que implicaría una situación epidemiológica compleja. Las condiciones climáticas y geográficas, asociadas a factores socio-culturales contribuyen al mantenimiento del ciclo del parásito en Neuquén (Pierangeli *et al.*, 2007).

Estudios previos mostraron que la provincia de Neuquén se caracteriza por presentar una gran diversidad de genotipos que infectan al ganado. Hasta el momento, se han descrito cuatro genotipos en ganado: *E. granulosus* sensu stricto G1 (en ovinos y caprinos) y G3 (ovinos); *E. canadensis* G6 (cabras y bovinos) y G7 (porcinos) (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010, 2015). En humanos se describieron infecciones con *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G6. La diversidad de genotipos en ganado es mayor que la que se encontró en humanos de Neuquén, sugiriendo que más genotipos podrían causar EQ en humanos de esa región.

Los estudios sobre la variabilidad genética de los genotipos de *E. granulosus* sensu lato que infectan a humanos de Neuquén involucraron el análisis de la secuencia parcial del gen mitocondrial *cox1*. Hasta el momento, no se han descrito secuencias completas del gen mitocondrial *cox1* ni haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en humanos de la provincia de Neuquén.

Considerando lo expuesto anteriormente, se plantea la necesidad de profundizar los conocimientos de la EQ en la provincia de Neuquén, dado que es una de las provincias con mayor incidencia en Argentina. Este trabajo pretende aportar conocimientos sobre la variabilidad genética y de expresión fenotípica de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato proveniente de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos y humanos de Neuquén, teniendo en cuenta que:

- 1) No existen estudios sobre la microdiversidad genética de los haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en quistes provenientes de ganado de Neuquén.

- 2) Se desconoce la distribución geográfica de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato que infectan a humanos de Neuquén.
- 3) No existen estudios sobre la microdiversidad genética de los haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en quistes provenientes de humanos de Neuquén.
- 4) El conocimiento acerca de aspectos biológicos y moleculares de la infección echinococcósica en humanos de Neuquén es escaso.
- 5) Existen pocos estudios que relacionen el genotipo del quiste con las características biológicas de los quistes y aspectos clínicos en humanos.
- 6) Existen pocos estudios que relacionen la respuesta inmune del paciente en función de las características biológicas de los quistes y aspectos clínicos en humanos.
- 7) Existe una importante variabilidad en las características biológicas y en la composición antigénica entre los genotipos de *E. granulosus* sensu lato provenientes de distintos HI y humanos.

Los conocimientos generados en este trabajo podrían contribuir para ajustar las medidas de prevención y control de la enfermedad en Neuquén y entender por qué sigue siendo una de las provincias con mayor incidencia de EQ en Argentina. Además, los resultados del presente trabajo podrían ser útiles para revisar las indicaciones sobre diagnóstico y manejo de los pacientes con EQ vigentes en la provincia.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2.1. Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética y fenotípica de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en hospedadores intermediarios y humanos de la provincia de Neuquén, Argentina.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la especie y el genotipo de los QH de *E. granulosus* sensu lato presentes en caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de la provincia de Neuquén.
2. Evaluar la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en QH provenientes de ganado de la provincia de Neuquén, utilizando una secuencia parcial del gen *cox1*.
3. Evaluar la relación entre el genotipo de los QH originados en ganado y la localización, el tamaño, fertilidad y viabilidad del quiste.
4. Determinar la especie y genotipo de los QH de *E. granulosus* sensu lato presentes en humanos de la provincia de Neuquén.
5. Evaluar la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en quistes provenientes de humanos de la provincia de Neuquén, utilizando la secuencia completa del gen *cox1*.
6. Describir los ciclos de transmisión de *E. granulosus* sensu lato en ganado y humanos de la provincia de Neuquén y determinar posibles relaciones entre ellos.
7. Caracterizar aspectos biológicos y clínicos de la infección con *E. granulosus* sensu lato en humanos de la provincia de Neuquén.
8. Evaluar la relación entre el genotipo de los QH originados en humanos y la edad, sexo, sintomatología, número de quistes del paciente, así como la localización, tamaño, fertilidad y viabilidad del quiste.
9. Comparar la sensibilidad de diferentes métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgG anti *E. granulosus* sensu lato en humanos.

10. Evaluar la respuesta inmune de pacientes con hidatidosis confirmada en relación con las variables: genotipo, localización anatómica, estadio según OMS, tamaño del QH, número de QH por paciente y edad del paciente.
11. Caracterizar el perfil proteico y antigénico del LH de origen caprino, ovino, bovino, porcino y humano, evaluando su relación con el hospedador, el genotipo, la localización y la fertilidad del quiste.
12. Evaluar la reactividad de los antígenos del LH, con énfasis en el AgB, provenientes de diferentes hospedadores y genotipos de *E. granulosus* sensu lato frente a un panel de sueros de pacientes con infección confirmada por *E. granulosus* sensu stricto (genotipo G1) y *E. canadensis* (genotipos G6 y G7), mediante inmunoblot.

2.3. Hipótesis de trabajo

- 1) La infección por *E. granulosus* sensu lato presenta en ganado características biológicas diferenciales según el hospedador intermediario, la localización, el genotipo y/o la fertilidad.
- 2) Existe diversidad de haplotipos de *E. granulosus* sensu lato que infectan al ganado de la provincia de Neuquén y se distribuyen de manera heterogénea dentro de la provincia.
- 3) Existe diversidad de haplotipos de *E. granulosus* sensu lato que infectan humanos de la provincia de Neuquén y se distribuyen de manera heterogénea dentro de la provincia.
- 4) Los humanos y el ganado de Neuquén son susceptibles a la infección con diferentes especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato. Existen simultáneamente ciclos sinantrópicos de EQ en la provincia de Neuquén.
- 5) La infección por *E. granulosus* sensu lato en humanos presenta características biológicas y clínicas diferentes según la localización anatómica, el genotipo, el tamaño, la fertilidad y/o viabilidad del QH, la edad, sexo y número de quistes por paciente.
- 6) El test serológico HAI presenta menor sensibilidad respecto a los otros métodos serológicos.

- 7) La respuesta inmune de los pacientes varía según el genotipo, la localización anatómica, el estadio según OMS, el tamaño del QH y el número de QH por paciente.
- 8) La composición proteica y antigénica del LH proveniente de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos y humanos de Neuquén varía según el hospedador, la localización, el genotipo y la fertilidad del quiste.
- 9) La reactividad de los antígenos del LH proveniente de diferentes hospedadores y genotipos de *E. granulosus* sensu lato difiere cuando se los enfrenta mediante inmunoblot a sueros de pacientes con infección confirmada por *E. granulosus* sensu stricto (genotipo G1) y/o *E. canadensis* (genotipos G6 y G7).

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los materiales y métodos empleados durante el desarrollo de este trabajo, divididos en secciones, ordenados según el objetivo específico para el cual se utilizaron. Salvo que se aclare explícitamente, todos los procedimientos descriptos fueron llevados a cabo en la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue.

Para desarrollar los objetivos propuestos el trabajo de tesis se dividió en tres estudios:

1. Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de la provincia de Neuquén
2. Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén
3. Aspectos inmunológicos de la infección por *E. granulosus* sensu lato en humanos

3.1. Estudio 1: Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de la provincia de Neuquén

En este estudio se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la especie y genotipo de los QH de *E. granulosus* sensu lato presentes en caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de la provincia de Neuquén.
2. Evaluar la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en QH provenientes de ganado de la provincia de Neuquén, utilizando una secuencia parcial del gen *cox1*.
3. Evaluar la relación entre el genotipo de los QH originados en ganado y la localización, el tamaño, fertilidad y viabilidad del quiste.

3.1.1. Área y período de estudio

El trabajo se realizó en la provincia de Neuquén, Argentina, entre marzo de 2014 y junio de 2018. La provincia de Neuquén tiene una superficie de 94.078 km² y está ubicada en el norte de la Patagonia, entre los 38°57'39" de latitud sur y los 68°04'28" de longitud oeste. El territorio está dividido en 16 departamentos (Figura 16). La población total provincial es de 551.266

habitantes (densidad 5,9 hab/km²). El 65,8% de la población está concentrado en el departamento Confluencia (362.673 hab; 49,3 hab/km²) (Dirección Provincial de Estadísticas y Censos, 2020).

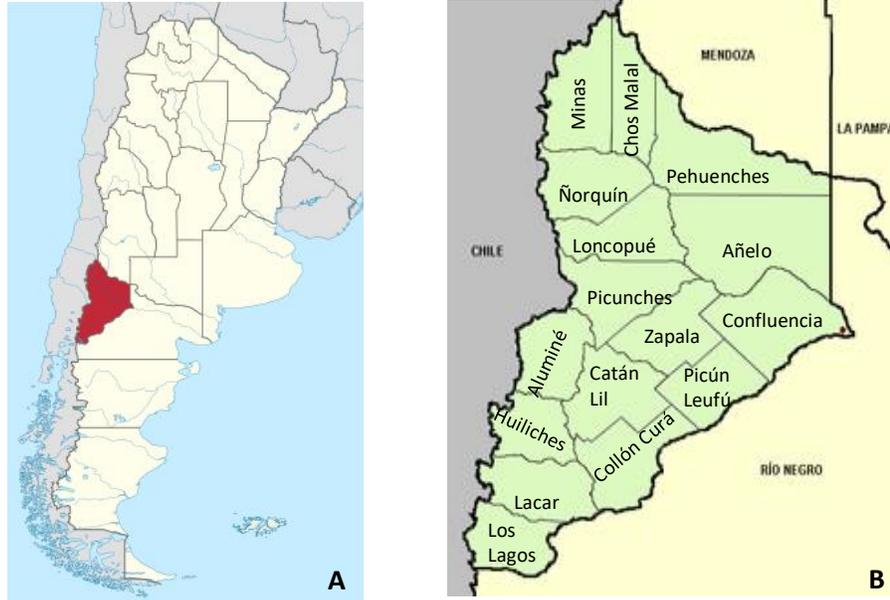


Figura 16. A: Ubicación de la Provincia de Neuquén en Argentina; B: Mapa político de la Provincia de Neuquén.

3.1.2. Diseño del estudio

En este estudio se aplicó un diseño observacional, descriptivo, comparativo, prospectivo y transversal.

3.1.3. Obtención y caracterización biológica del material parasitario

Los QH se obtuvieron a partir de caprinos (*Capra hircus*), ovinos (*Ovis aries*), bovinos (*Bos taurus*) y porcinos (*Sus scrofa*) faenados en mataderos habilitados de la provincia de Neuquén, bajo control veterinario. Se realizó la búsqueda de los quistes en las vísceras por observación macroscópica y palpación de los órganos (hígado, pulmones, riñones, bazo, corazón, peritoneo). Se registró el tipo de ganado, la edad, procedencia, el/los órganos afectados y la cantidad de QH detectados. Las porciones de los órganos que contenían los QH se colocaron en recipientes

plásticos individuales de cierre hermético y fueron remitidas refrigeradas al laboratorio dentro de las 48 horas de su obtención.

3.1.4. Procesamiento de los quistes hidatídicos

Los QH fueron procesados inmediatamente después de la recepción en el laboratorio. El procesamiento de los QH incluyó:

3.1.4.1. Separación de los elementos del quiste y recuento de protoescolices

El contenido de cada QH de ganado (LH y PSC) se obtuvo por punción aspiración con jeringa y aguja estéril, y se colocó en tubos de centrifuga estériles (Figura 17). Luego de la punción, las capas (germinal y laminar) se separaron cuidadosamente con bisturí y pinzas estériles y se cortaron en porciones. Se registró el aspecto de las capas y se conservaron en etanol 70% a -20°C para biología molecular. Posteriormente, el tubo con el contenido del QH se centrifugó a $800 \times g$ durante 5 minutos para clarificar el LH y se conservaron el sedimento (PSC) y el sobrenadante (LH clarificado) para ser utilizado posteriormente en el estudio 1 (ítem 3.1.5.1.) y estudio 3 (ítem 3.3.2.), respectivamente. El sedimento con PSC se separó en 2 alícuotas: a) para estudio de fertilidad y viabilidad, y b) para análisis por biología molecular.



Figura 17. Procesamiento de los quistes hidatídicos. A) Medición del diámetro mayor; B) Punción del quiste; C) Extracción de capas.

3.1.5. Determinación de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato

3.1.5.1. Procesamiento del material parasitario

Para cada muestra se procesaron de 25 mg a 100 mg de PSC y/o capa germinal del QH obtenidos en el apartado 3.1.4.1. Se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para remover

el alcohol 70% y luego las muestras se sometieron a 3 ciclos de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelación para facilitar la ruptura de tejidos.

3.1.5.2. Extracción de ADN

La extracción se realizó con el equipo comercial de QIAamp® DNA mini kit (Qiagen), que permite la purificación de ADN a partir de tejidos sólidos mediante columnas de afinidad. Se siguieron las instrucciones del fabricante que incluyó los siguientes pasos:

- 1) Lisis con 20 μl de Proteinasa K en 180 μl de buffer ATL a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación hasta lisis completa (1 a 3 horas)
- 2) Agregado de 200 μl de buffer AL, homogeneización mediante vórtex durante 15 segundos e incubación a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos
- 3) Adición de 200 μl de etanol absoluto, homogeneización mediante vórtex durante 15 segundos y transferencia de la mezcla de reacción a la columna de afinidad que se colocó dentro de un tubo limpio de 2 ml de capacidad
- 4) Centrifugación a $6.000 \times g$ durante 1 minuto y descarte del líquido eluido (en este paso el ADN quedó retenido en la membrana de la columna para ser luego liberado de impurezas en los pasos 5 y 6)
- 5) Transferencia de la columna a un nuevo tubo de elución, agregado de 500 μl de buffer AW1, centrifugación a $6.000 \times g$ durante 1 minuto y descarte del líquido eluido
- 6) Transferencia de la columna a nuevo tubo de elución, agregado de 500 μl de buffer AW2 seguido de centrifugación a $20.000 \times g$ durante 3 minutos y descarte del líquido eluido
- 7) Transferencia de la columna a tubo eppendorf estéril, agregado de 200 μl de buffer de elución e incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos
- 8) Centrifugación a $6.000 \times g$ durante 1 minuto y recolección del líquido eluido que contiene el ADN extraído
- 9) Reiteración de los pasos 7) y 8) para obtención de una 2° fracción de ADN
- 10) El ADN obtenido se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su amplificación.

3.1.5.3. Amplificación de ADN

Para la determinación del genotipo se amplificó una porción de aproximadamente 450 pares de bases (pb) del gen mitocondrial que codifica para la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa -cox1- utilizando los siguientes primers (Bowles *et al.*, 1992):

Forward -FJB3- : 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'

Reverse -RJB4.5-: 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador BIOER (Life Thermal Cycler). La composición final de la mezcla de reacción para la PCR fue: 2 mM de MgCl₂; Buffer NH₄⁺; 0,75 µg/µl de albúmina bovina; 0,120 mM de cada dNTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU); 0,5 µM de cada primer (Genbiotech) y 0,04 U/µl de la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) (Genbiotech). Se utilizaron 2 µl de templado en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron: una fase inicial de 5 minutos a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 30 segundos a 52 °C (hibridación) y 30 segundos a 72 °C (elongación), y una fase final de elongación de 5 minutos a 72 °C. Se realizaron corridas electroforéticas de una alícuota de los productos de la PCR en geles de agarosa (Invitrogen, España) al 2% (p/v) preteñidos con Gel Red® (Biotium), utilizando un patrón de peso molecular de 100 pb (Genbiotech). Las corridas se realizaron en buffer Tris bórico EDTA (TBE) pH 8,0 a 120 V durante 30 minutos y los geles se analizaron por visualización bajo luz ultravioleta.

3.1.5.4. Secuenciación

Los productos de PCR se purificaron utilizando métodos comerciales (AxyPrep® PCR Purification Kit, Axygen Biosciences) y se secuenciaron utilizando un secuenciador automático 3730XL (Macrogen, Corea). La secuenciación de los productos de PCR se realizó en ambas direcciones.

3.1.5.5. Análisis e interpretación de las secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante los programas informáticos ClustalX v2.1., Bioedit v.7.2.5 y Mega 7 (Thompson *et al.*, 1997; Hall, 1999; Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias se alinearon y compararon con secuencias de *E. granulosus* sensu lato publicadas en

GenBank (Números de acceso en GenBank *cox1*: U50464, M84662 a M84667, AB235848 y AF525457). La posición de las bases en las secuencias del gen *cox1* se determinó utilizando como referencia el fragmento de 366 pb descrito por Bowles *et al.* (1992). Las secuencias obtenidas en este estudio fueron publicadas en GenBank. Los árboles filogenéticos se construyeron mediante el método de Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de dos parámetros de Kimura con 1000 replicaciones aleatorias (Kimura, 1980).

La identificación de haplotipos y el análisis de redes se realizó utilizando el software NETWORK 10.0.0.0 (Polzin and Daneshmand, 2003). La secuencia de aminoácidos se infirió de la secuencia de nucleótidos del código genético mitocondrial de platelmintos (Nakao *et al.*, 2000). Las secuencias de aminoácidos obtenidas se compararon con las secuencias de aminoácidos de referencia, utilizando el software Geneious 11.1.5, para determinar si las sustituciones de nucleótidos eran sinónimas o no. Se calcularon los índices de diversidad (H_d : diversidad de haplotipos y π : diversidad nucleotídica) y de neutralidad (Tajima's D and Fu's F_s) utilizando el software DnaSp 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009). El test de Tajima's D se aplicó para medir las diferencias entre el número esperado de sitios segregantes (frecuencia de mutaciones) y la expectativa del número promedio de diferencias nucleotídicas entre secuencias de ADN. Esta prueba emplea las distribuciones normales estándar y beta para determinar si el índice es significativamente diferente de cero, en este sentido, la significancia de D puede estar enmarcada en las siguientes premisas: 1) Si es negativo muestra expansión poblacional; 2) Si es positivo refleja selección balanceada, con muchas mutaciones en frecuencias intermedias en la población (Tajima, 1989; Tajima, 1996). Por otra parte, el test de Fu's F_s se utilizó para comparar el número de haplotipos observados con el número de haplotipos esperados en una muestra al azar, asumiéndose un modelo infinito sin recombinación. De acuerdo con lo descrito por Fu (1997), F_s es más sensible a la expansión demográfica, mostrando usualmente valores negativos.

3.1.6. Evaluación de la fertilidad de quistes hidatídicos

Se determinó la fertilidad del quiste, utilizando el sedimento obtenido en el ítem 3.1.4.1, según la presencia o ausencia de PSC por observación en microscopio óptico con aumento de

100x (Tashani *et al.*, 2002). Se identificó como “fértil” al QH que tuviera por lo menos un PSC o ganchos de PSC sueltos. La alícuota b se conservó en etanol 70% a -20°C hasta su utilización.

3.1.7. Evaluación de la viabilidad de quistes hidatídicos

El porcentaje de PSC viables presentes en cada QH fértil se determinó a partir del sedimento obtenido en el ítem 3.1.4.1. La viabilidad se evaluó por coloración vital con Azul Tripán 0,4% (García Llamazares *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997), forma y tamaño de los PSC y/o presencia de células flamígeras (Eckert *et al.*, 1993; Derbala & El-Massry, 1999; Scala *et al.*, 2006). Se evaluaron 200 PSC/QH en microscopio óptico con aumento de 400x, y se calculó el porcentaje de PSC viables (Figura 18).

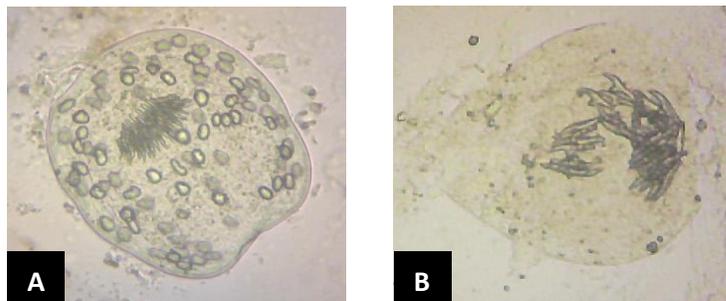


Figura 18. Protoescolícos viables (A) y no viables (B). Microfotografías (400x) tomadas en el presente trabajo de tesis.

3.1.8. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico InfoStat para Windows v2017e, aplicando métodos de estadística descriptiva e inferencial con pruebas paramétricas. Para el análisis de variables cualitativas se utilizó el método de χ^2 con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los resultados de las variables numéricas individuales se expresaron como promedio (\bar{X}), desvío estándar (DE) e intervalos de confianza del 95% (IC 95%). El análisis comparativo de los resultados según las variables independientes fue realizada con Test de Student con un nivel de significación $p < 0,05$.

3.2. Estudio 2: Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén

En este estudio se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

4. Determinar la especie y genotipo de los QH de *E. granulosus* sensu lato presentes en humanos de la provincia de Neuquén.
5. Evaluar la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de *E. granulosus* sensu lato en quistes provenientes de humanos de la provincia de Neuquén, utilizando la secuencia completa del gen *cox1*.
6. Describir los ciclos de transmisión de *E. granulosus* sensu lato en ganado y humanos de la provincia de Neuquén y determinar posibles relaciones entre ellos.
7. Caracterizar aspectos biológicos y clínicos de la infección con *E. granulosus* sensu lato en humanos de la provincia de Neuquén.
8. Evaluar la relación entre el genotipo de los QH originados en humanos y la edad, sexo, número de quistes del paciente, así como la localización, el tamaño, fertilidad y viabilidad del quiste.

3.2.1. Área y período del estudio

Este estudio se realizó en la provincia de Neuquén, Argentina, entre enero de 2013 y julio de 2018.

3.2.2. Diseño del estudio

En este estudio se aplicó un diseño observacional, descriptivo, comparativo, prospectivo y transversal.

3.2.3. Obtención y caracterización del material parasitario

Las muestras de QH humanos fueron obtenidos de pacientes con hidatidosis confirmada por cirugía en diferentes hospitales públicos y privados de la provincia de Neuquén. Las muestras correspondieron a una porción de capa laminar, germinal y/o LH obtenidos de cada QH por los cirujanos. Para este estudio el criterio de inclusión fue: QH de pacientes con hidatidosis operados en la provincia de Neuquén durante el período de estudio. El criterio de exclusión fue: pacientes

que presentaban QH hepáticos de estadio CE5, debido a que este tipo de quistes en Neuquén sólo recibe tratamiento “*Watch and wait*”. El material parasitario se envió refrigerado al laboratorio en un lapso de no más de 6 horas. Se registró el/los órganos afectados, cantidad de QH y aspecto de la capa del QH. No se realizó un pool de quistes ya que cada QH fue considerado una muestra individual. Las membranas se conservaron en etanol 70,0% a -20°C para biología molecular. El LH recibido se centrifugó a 800 x *g* durante 5 minutos para clarificar, se conservó el sedimento (PSC) y el sobrenadante (LH clarificado) para ser utilizado posteriormente en el estudio 3 (ítem 3.3.2). El sedimento con PSC se separó en 2 alícuotas: a) para el análisis por biología molecular, y b) para estudio de fertilidad y viabilidad.

3.2.3.1. Características moleculares y biológicas del quiste

La especie y genotipo de los QH se determinó según el ítem 3.1.5 del Estudio 1. La fertilidad y viabilidad se determinó de acuerdo al ítem 3.1.6 y 3.1.7 del Estudio 1. Para el análisis de la fertilidad y viabilidad, en los pacientes que presentaban más de un quiste se consideraron los quistes que eran fértiles y de aquellos quistes fértiles los que presentaban mayor viabilidad. Las medidas de los QH humanos fueron obtenidas por imágenes antes de la cirugía del paciente. Los QH hepáticos se clasificaron de acuerdo a las recomendaciones de la OMS según la actividad del quiste: quistes activos CE1 y CE2, quistes transicionales CE3a y CE3b, y quistes inactivos CE4 y CE5.

3.2.3.2. Características clínicas del paciente

Se registró la edad, sexo, procedencia y sintomatología del paciente previo a la cirugía. También se registró si el paciente presentó tratamiento previo. Los pacientes que presentaban más de un quiste se clasificaron de acuerdo al quiste más activo y en el caso de la sintomatología se tomaron los quistes más grandes. El número de datos analizados dependió la disponibilidad de información para cada variable.

3.2.3.3. Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por la Comisión Asesora de Investigaciones Biomédicas en Seres Humanos (CAIBSH) de la Subsecretaría de Salud de la Provincia de Neuquén. N° de expediente:

4420-138451/2013. Todos los sujetos adultos y padres/tutores de los niños dieron su consentimiento informado por escrito para la cirugía. La información de los pacientes fue codificada para que no puedan ser identificados.

3.2.4. Determinación de haplotipos de *Echinococcus granulosus sensu lato* en humanos

Para el estudio de haplotipos de QH humanos se realizó la secuenciación completa del gen *cox1* (1609 pb) de *E. granulosus sensu lato*. La secuenciación completa del gen *cox1* fue llevada a cabo en el Instituto de Parasitología de la Universidad de Zurich, con la dirección del Dr. Peter Deplazes, bajo la supervisión del Dr. Cristian Alvarez Rojas.

3.2.4.1. Amplificación del gen completo *cox1*

Se incluyeron en este estudio los aislamientos que presentaron una cantidad de ADN mayor o igual a 100 ng. Se amplificó la secuencia completa del gen *cox1* (1608-1609 pb) de *E. granulosus sensu lato* del ADN extraído según la metodología descrita en el ítem 3.1.5.2. del Estudio 1 utilizando los siguientes primers (Hüttner *et al.*, 2008):

Forward: 5'-TTACTGCTAATAATTTTGTGTCAT-3'

Reverse: 5'-GCATGATGCAAAGGCAAATAAAC-3'

Las condiciones de PCR fueron: una fase inicial de 3 minutos a 98 °C, seguidos de 34 ciclos de 10 segundos a 98 °C (desnaturalización), 30 segundos a 59 °C (hibridación), 45 segundos a 72 °C (elongación), y una fase final de elongación de 10 minutos a 72 °C. La composición de la mezcla de reacción para la PCR fue: 200 µM dNTPs, 0,5 µM de cada primer (Microsynth), 5X Phusion HF Buffer, 0,6 U/µl de la enzima ADN polimerasa (Phusion high fidelity DNA polymerase, NEB®). Se utilizaron 3 µl de templado en un volumen final de 30 µl.

En los casos en que la amplificación resultó negativa, 3 µl de la primera reacción de PCR fueron utilizados para una nested PCR para amplificar la porción 5' del gen *cox1* (800 pb) utilizando los siguientes primers (Alvarez Rojas *et al.*, 2016):

Forward: 5'-GTTAGTTTTGACTGTACGTTTTCA-3'

Reverse: 5'- ATCAACACATAAACCTCAGG-3'

Las condiciones de PCR fueron similares a la primera PCR, excepto la temperatura de hibridación que se utilizó 56 °C.

También se tomó una alícuota de 3 µl de la primera reacción de PCR para amplificar la porción 3' del gen *cox1* (1104 pb), incluyendo una secuencia que se superpone con el producto de PCR de la porción 5', utilizando los siguientes primers:

Forward: 5'-CTGTTTTGTTATTGGTTACGTTGC-3' (Alvarez Rojas *et al.*, 2016)

Reverse: 5'-CACAAATTAACAACCAGGTCAATG-3' (Hüttner *et al.*, 2008)

Las condiciones de PCR fueron similares a la primera PCR, excepto la temperatura de hibridación que se utilizó 66 °C.

Se realizaron corridas electroforéticas de una alícuota de 5 µl de los productos de la PCR en geles de agarosa (Invitrogen) al 2% (p/v) preteñidos con Gel Red® (Biotium), utilizando un patrón de peso molecular de 100 pb (Sigma®). Las corridas se realizaron en buffer TBE pH 8,0 a 100 V durante 30 minutos y los geles se analizaron por visualización bajo luz ultravioleta.

3.2.4.2. Secuenciación

Los productos de PCR se purificaron utilizando el método comercial MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante con un pequeño cambio. Para ello se agregaron 125 µl de buffer PB a 25 µl del producto de PCR y se colocaron en una columna MinElute®. Se centrifugó durante 1 minuto a 20.000 x *g* y se descartó el filtrado. Luego se agregaron 750 µl de Buffer PE a la columna MinElute®, se centrifugó durante 1 minuto a 20.000 x *g*, se descartó el filtrado y se colocó la columna MinElute® en un tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml. Para eluir el ADN se agregaron 13 µl de Buffer EB, se incubó durante 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 20.000 x *g*.

Se realizó secuenciación Sanger (Microsynth, Suiza) de los productos purificados. La secuencia completa del gen *cox1* se construyó utilizando como referencia las secuencias EG01 de *E. granulosus* sensu stricto (número de acceso: JQ250806) y Ec01 de *E. canadensis* (número de acceso: KX010830) utilizando el software Geneious 11.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). Sólo se aceptaron los electroferogramas con un solo pico para cada base; en el caso de ambigüedades o picos

dobles, los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias completa del gen *cox1* obtenidas fueron publicadas en GenBank.

3.2.4.3. Construcción de redes de haplotipos

La identificación de haplotipos y el análisis de redes se realizó utilizando el software TCS 1.21 con un límite de conexión de 95 % (Clement *et al.*, 2000). La secuencia de aminoácidos se infirió de la secuencia de nucleótidos del código genético mitocondrial de platelmintos (Nakao *et al.*, 2000). Se calcularon los índices de diversidad (H_d y π) y de neutralidad (Tajima's D and Fu's F_s) utilizando el software DnaSp 5.10.1 (Librado and Rozas, 2009).

Además, se realizaron dos redes de haplotipos, una para *E. granulosus* sensu stricto y otra para *E. canadensis*. La red de haplotipos para *E. granulosus* sensu stricto se construyó con las secuencias descritas en este estudio y las secuencias de *E. granulosus* sensu stricto de 1609 pb descritas en países de América del Sur (Chile, Bolivia y Perú). La red de haplotipos para *E. canadensis* G6 se construyó con las secuencias descritas en este estudio y las secuencias de *E. canadensis* G6 de 1608 pb descritas en América del Sur y, para aumentar el número de secuencias en la red de haplotipos y así posicionar la provincia de Neuquén en un contexto geográfico más amplio, se incluyeron las secuencias de los genotipos G6 de 1608 pb publicadas en Genbank.

3.2.5. Descripción de los ciclos de transmisión de *E. granulosus* sensu lato en ganado y humanos

Mediante la información sobre la fertilidad y el genotipo obtenida de los QH en ganado y humanos y la distribución geográfica de los hospedadores se describieron los ciclos de transmisión *E. granulosus* sensu lato en ganado y humanos de la provincia de Neuquén.

3.2.6. Análisis estadístico de los datos

Se calculó el número de casos de EQ por 100.000 habitantes para cada departamento de la provincia de Neuquén obtenidos en este trabajo de tesis durante el período de enero 2013 a junio 2018. El cálculo se realizó sobre la base de los registros oficiales de población (Censo 2010) y una tasa de crecimiento estimada de 1,5% (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020). El número de casos de EQ por 100.000 habitantes para cada departamento se calculó como el

número de pacientes analizados en este estudio en función de toda la población de ese departamento durante el período de enero 2013 a junio 2018.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico InfoStat para Windows v2017e, aplicando métodos de estadística descriptiva e inferencial con pruebas paramétricas. Para el análisis de variables cualitativas se utilizó el método de χ^2 con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los resultados de las variables numéricas individuales se expresaron como promedio (\bar{X}), desvío estándar (DE) e intervalos de confianza del 95% (IC 95%). El análisis comparativo de los resultados según las variables independientes fue realizado con Test de Student (para 2 grupos) con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

3.3. Estudio 3: Aspectos inmunológicos de la infección por *Echinococcus granulosus sensu lato* en humanos

En este estudio se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

9. Comparar la sensibilidad de diferentes métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgG anti *E. granulosus sensu lato* en humanos.
10. Evaluar la respuesta inmune de pacientes con hidatidosis confirmada en relación con las variables: genotipo, localización anatómica, estadio según OMS, tamaño del QH, número de QH por paciente y edad del paciente.
11. Caracterizar el perfil proteico y antigénico del LH de origen caprino, ovino, bovino, porcino y humano, evaluando su relación con el hospedador, el genotipo, la localización y la fertilidad del quiste.
12. Evaluar la reactividad de los antígenos del LH, con énfasis en el AgB, provenientes de diferentes hospedadores y genotipos de *E. granulosus sensu lato* frente a un panel de sueros de pacientes con infección confirmada por *E. granulosus sensu stricto* (genotipo G1) y *E. canadensis* (genotipos G6 y G7), mediante inmunoblot.

3.3.1. Evaluación de la sensibilidad de diferentes métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgG anti *Echinococcus granulosus sensu lato*

Se obtuvo una muestra de sangre de los pacientes con hidatidosis confirmada estudiados en el momento previo a la cirugía. La muestra de sangre se centrifugó a 800 x *g* durante 5 min para obtener el suero y se conservó hasta su utilización a -20°C. La serología se realizó por tres métodos comerciales: HYDATIDOSIS ELISA IgG (Vircell®), test inmunocromatográfico rápido (TIR) VIRAPID® HYDATIDOSIS (Vircell®) y hemoaglutinación indirecta (HAI) HIDATEST® (Laboratorio Lemos S.R.L.), siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso.

El método de ELISA cuantitativo comercial, HYDATIDOSIS ELISA IgG (Vircell®), es una prueba inmunoenzimática indirecta estandarizada para determinar anticuerpos IgG frente a *E. granulosus* en suero humano. El kit utiliza antígeno purificado y enriquecido con las fracciones de Ag5 y AgB obtenido a partir de LH de quistes hepáticos ovinos. Las muestras de suero se evaluaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se agregaron 100 µl del diluyente de suero a

los pocillos de la policubeta. Se agregaron 5 µl de suero, control de cut off, positivo y negativo. Se homogeneizó y se incubó a 37°C por 45 minutos. Luego se realizaron 5 lavados con solución de lavado, se agregaron 100 µl de la solución de conjugado IgG y se incubó a 37 °C por 30 minutos. A continuación se realizaron 5 lavados, se agregaron 100 µl de solución de sustrato y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente se agregaron 50 µl de solución de parada y se midió la absorbancia a 450/620 en un espectrofotómetro.

El test inmunocromatográfico rápido (TIR) VIRAPID® HYDATIDOSIS (Vircell®) es un método semicuantitativo que utiliza antígeno de *E. granulosus* enriquecido con fracciones de Ag5 y AgB y purificado por HPLC. Las muestras de suero se evaluaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se agregó 30 µl de suero al pocillo del casete y luego 2 gotas de solución de revelado proporcionado en el kit. Se leyó el resultado a los 30 minutos, evaluando la intensidad del resultado de acuerdo a la escala de referencia del kit.

La prueba cualitativa de Hemaglutinación Indirecta, HIDATEST®, se prepara sensibilizando hematíes de carnero con antígeno obtenido a partir del LH capaz de reconocer anticuerpos contra *E. granulosus* sensu lato. Las muestras de suero se evaluaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se trataron 100 µl de suero con 100 µl de 2-Mercaptoetanol diluido 1/100 con solución fisiológica y se incubaron durante 30 min a 37°C. Luego se agregaron 200 µl de solución fisiológica a la mezcla anterior. Se colocaron 25 µl de esta mezcla en un pocillo de una policubeta con fondo en U y se agregaron 25 µl de Diluyente de Muestras proporcionado en el kit. Se homogeneizó por carga y descarga, y se descartaron 25 µl luego de hacer la dilución. Se depositaron 25 µl de antígeno proporcionado en el kit y se agitó la policubeta. Se dejó la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante 90 minutos. En las muestras de suero positivas se observó un manto en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, ocupando más del 50% del mismo. En la muestras de suero negativas se observó un botón nítido o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

La sensibilidad de los tests serológicos se calculó como el porcentaje de pacientes positivos detectados en el total de individuos con EQ. Se comparó la sensibilidad de los tres métodos comerciales

3.3.2. Evaluación de la respuesta inmune de pacientes con hidatidosis en función de distintas variables

En base a la sensibilidad de los tests serológicos que se calculó en el ítem 3.3.1 se eligió el mejor método para la evaluación de la respuesta inmune. Se calculó el porcentaje de positividad de la serología de los pacientes. Se relacionó el porcentaje de positividad con las variables: genotipo, localización anatómica, estadio según OMS, tamaño del QH, número de QH por paciente y grupo etario.

3.3.3. Obtención y procesamiento del líquido hidatídico

3.3.3.1. Caracterización y fraccionamiento del LH

Los LH clarificados se obtuvieron en los ítems 3.1.4.1 para ganado y 3.2.3 para humanos. Se registraron las características físicas del LH (volumen, aspecto, color) y los LH se conservaron para estudiar los perfiles de proteínas a -20°C.

3.3.3.2. Concentración y conservación del LH

El mayor volumen posible de LH clarificado se colocó en un tubo de Visking armado con membrana de diálisis del tamaño adecuado, que luego se ubicó en una placa de Petri con Carbowax (Polietilenglicol 6000) a 4°C durante 12-18 horas, para reducir el volumen de líquido. Se midieron los volúmenes inicial y final del LH. El LH concentrado se recuperó del tubo de concentración con pipeta plástica, se colocó en un tubo de microcentrífuga, se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.3.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Los LH concentrados se centrifugaron a 10.000 x g a 4°C durante 15 minutos y la concentración de proteínas se determinó en el sobrenadante por el método de Bradford (1976), utilizando un equipo de Bio-Rad® siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de proteínas se ajustó a 15 µg/µl para estandarizar las corridas. La determinación del perfil proteico de los LH se realizó mediante geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras, siguiendo el método descripto por Laemmli (1970). Para ello, se prepararon geles concentradores al 4% (m/v) y geles separadores de 12.5% (m/v) de acuerdo a

las necesidades de las muestras a analizar, con un espesor de 1.0 mm, 6 cm de altura, 8 cm de largo y 10 pocillos, empleando el equipo *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad®). Se sembraron 10 µl de muestra diluida en relación 1:1 en buffer muestra a pH 6,8 (Tris-HCl 0,5 M, SDS 10% conteniendo glicerol 20% y azul de bromofenol 0,05%) y 5 µl de marcador de peso molecular (PM) preteñido, de rango 6.5 a 270 KDa (BIO-HELIX Co., Keelung City, Taiwan). Los geles se corrieron en una solución de corrida Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3 a 60 miliamperios (mA) constante por gel durante 1 hora 30 minutos, en baño de hielo. Al finalizar la corrida los geles se fijaron con ácido tricloroacético 12,5% durante 10 minutos y luego se colorearon con Azul de Coomassie (Biomerica®) para visualización de las proteínas (Gallagher *et al.*, 2007). Los geles se decoloraron con una mezcla de metanol 25% y ácido acético 10% en agua destilada, con agitación a TA hasta visualización correcta de las bandas. Los geles fueron fotografiados para registrar las bandas obtenidas. Se estimó el PM de las bandas para cada corrida mediante el gráfico de log PM de las bandas obtenidas con el marcador de PM en función de la movilidad electroforética relativa (Rf) de las bandas en las muestras (Rf= distancia de la banda en cuestión/distancia del frente de corrida) (Margni *et al.*, 1996).

3.3.5. Caracterización antigénica del líquido hidatídico

3.3.5.1. Transferencia de los geles

El perfil antigénico de los LH se realizó por immunoblotting (Tobwin *et al.*, 1979, Gallagher *et al.*, 2011). Luego de la corrida en SDS-PAGE de los LH concentrados y del marcador de PM, los geles se colocaron 5 minutos con agitación en buffer TBS (Tris 0,05 M; NaCl 0,15 M, pH 7,4) para remover las sales. La transferencia de las proteínas se realizó a membranas de fluoruro de polivilideno (PVDF) Westran S® (Whatman Inc.), de 0,2 µm de tamaño de poro, con buffer de transferencia a pH 8,3 (Tris 25mM/ glicina 192mM/ metanol 20% v/v) durante 75 minutos a 100 voltios (V) en baño de hielo en un equipo *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad®). Al finalizar la transferencia, las membranas fueron teñidas con Rojo Ponceau 0,2% en ácido tricloroacético 3% durante 15 minutos a TA para visualizar las bandas transferidas. Posteriormente, las calles se marcaron, cortaron y se conservaron en TBS protegidas de la luz a 4°C hasta su utilización.

3.3.5.2. Inmunoblotting

Para la detección de los antígenos del LH se realizó el blotting de las membranas de PVDF (obtenidos en el punto anterior), con sueros de humanos con diagnóstico confirmado de hidatidosis y con sueros humanos controles (pacientes sanos). Se seleccionaron los sueros de pacientes a los que se les había podido determinar el genotipo del QH con el cual habían sido infectados y que presentaban serología positiva con título alto de anticuerpos realizado por los métodos diagnósticos descritos en el ítem 3.2.2 del estudio 2. Las membranas se prepararon previamente rehidratándolas por pasos sucesivos en metanol, agua destilada y luego en buffer Tris salino (TBS) con 5% de leche descremada durante 1 hora a TA. Las membranas se incubaron con una dilución 1:200 del suero humano en TBS-leche 5% a pH 7,4 en oscuridad a 4°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente se realizaron 6 lavados de 15 minutos cada uno con TBS- leche 5% con agitación a TA. Las membranas se incubaron luego con el conjugado (anti-IgG humana obtenida en conejo (Sigma®) marcada con peroxidasa), en dilución 1:2000 en TBS-leche 5 %, durante 2,5 horas a TA con agitación en oscuridad. Se realizaron 4 lavados y se reveló por incubación con el cromógeno preparado en el momento (1 volumen de 4-cloronaftol (Sigma®) 0,3% en metanol, 0,004 volúmenes de H₂O₂ 30% y 5 volúmenes de TBS) hasta aparición de las bandas (Gallagher *et al.*, 2011). Las imágenes se registraron inmediatamente con cámara fotográfica. Los PM de las bandas se calcularon igual que en el ítem 3.3.3.

3.3.6. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico InfoStat para Windows v2017e, aplicando métodos de estadística descriptiva e inferencial con pruebas paramétricas. Para el análisis de variables cualitativas se utilizó el método de χ^2 con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO 1: Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de la provincia de Neuquén.

Para realizar la caracterización de los QH se incluyeron 97 quistes obtenidos de los siguientes HI domésticos de la provincia de Neuquén: caprinos (32), ovinos (18), bovinos (23) y porcinos (24). Los QH de caprinos se obtuvieron en mataderos habilitados de los departamentos de Chos Malal, Minas y Pehuenches; los de ovinos de los departamentos Confluencia y Minas; los de bovinos de los departamentos Chos Malal y Minas; y los de porcinos del departamento Confluencia (Figura 19).



Figura 19. Localidades de procedencia de quistes hidatídicos analizados en este trabajo de tesis.
1: Andacollo; 2: Chos Malal; 3: Curacó; 4: Centenario; 5: Neuquén; 6: Plottier; 7: Aluminé.

4.1.1. Caracterización de las especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato de los quistes de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de Neuquén

Se genotipificaron 81 QH obtenidos de los caprinos (29), ovinos (18), cerdos (23) y bovinos (11) mediante amplificación por PCR de una fracción del gen mitocondrial que codifica para *cox1* y posterior secuenciación. Las muestras restantes no dieron PCR positiva probablemente debido a baja calidad del ADN.

Los productos de amplificación del fragmento del gen *cox1* mostraron bandas únicas de intensidad adecuada en las corridas electroforéticas en geles de agarosa teñidos con Gel Red (Figura 20).

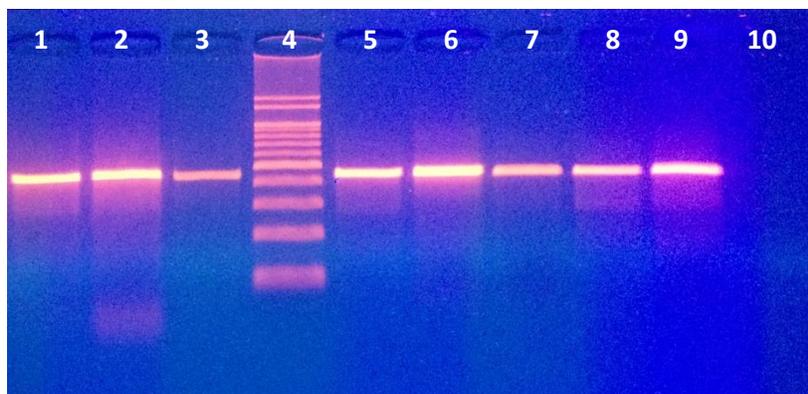


Figura 20. Corrida electroforética en gel de agarosa 2% preteñido con Gel Red de los productos de amplificación del fragmento del gen mitocondrial *cox1*. Calles 1 a 3, 5 a 9: *cox1* (450 pb); calle 4: patrón de peso molecular de 100 pb; calle 10: control negativo.

El análisis de las secuencias de los productos de PCR demostró la presencia de las siguientes especies y genotipos en los QH obtenidos en la provincia de Neuquén: 31 aislamientos correspondieron a diversos haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1; 28 correspondieron a *E. canadensis* genotipo G6; y 22 correspondieron a *E. canadensis* genotipo G7. No se observaron diferencias significativas en el número de aislamientos según el genotipo ($\chi^2=1,2475$; $p=0,2640$). La distribución de los genotipos de *E. granulosus* sensu lato según el HI se presenta en la tabla 2.

La asociación estadística entre el genotipo y el HI se analizó mediante test de χ^2 . Se encontró asociación estadísticamente significativa para: *E. canadensis* G6 y caprinos ($\chi^2=21,55$;

$p < 0,0001$); *E. canadensis* G7 y porcinos ($\chi^2 = 16,20$; $p = 0,0001$); *E. granulosus* sensu stricto G1 y ovinos ($\chi^2 = 6,11$; $p < 0,01$) y *E. granulosus* sensu stricto G1 y bovinos ($\chi^2 = 7,36$; $p = 0,0067$).

Tabla 2. Distribución de especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato identificados en quistes hidatídicos de hospedadores intermediarios de Neuquén (n=81)

Especies de <i>E. granulosus</i> sensu lato	Genotipos	Hospedadores intermediarios				Total por genotipo n
		Caprinos n (%) ^a	Ovinos n (%) ^a	Porcinos n (%) ^a	Bovinos n (%) ^a	
<i>E. granulosus</i> sensu stricto	G1	2 (6,9)	18 (100,0)	1 (4,3)	10 (90,9)	31
<i>E. canadensis</i>	G6	27 (93,1)	-	-	1 (9,1)	28
	G7	-	-	22 (95,7)	-	22
Totales por HI		29 (100,0)	18 (100,0)	23 (100,0)	11 (100,0)	81

a: n= número de aislamientos de cada genotipo por HI; %= porcentaje de aislamientos de cada genotipo por HI

4.1.2. Distribución espacial de las especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato de los quistes de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de Neuquén

La distribución espacial por departamento de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato, así como los HI involucrados, se presentan en la figura 21. La distribución de los genotipos por HI en cada departamento mostró que en Chos Malal los caprinos y los bovinos albergaron QH de los genotipos G1 y G6. En el departamento Minas los QH de caprinos fueron G6 y los de ovinos G1. En los caprinos de Añelo se encontraron QH del genotipo G6. En el departamento Aluminé los QH de bovinos fueron G1. Todos los QH G1 y G7 de porcinos se localizaron en el departamento Confluencia y los QH de ovinos encontrados en este departamento correspondieron al genotipo G1.



Figura 21. Distribución espacial por departamento de especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato y tipo de HI de aislamientos de Neuquén (n=81). Departamentos: 1= Minas, 2= Chos Malal; 3= Pehuenches; 4= Confluencia; 5= Aluminé.

4.1.3. Evaluación de la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato en quistes de ganado de la provincia de Neuquén, utilizando la secuencia parcial del gen *cox1*

Para determinar los haplotipos presentes en Neuquén de *E. granulosus* sensu stricto G1 en distintos HI se analizaron 26 secuencias del fragmento del gen *cox1* (366 pb) que presentaban buena calidad de ADN. Se encontraron 3 haplotipos: el genotipo G1 (n=23) descrito originalmente por Bowles *et al.* (1992), G1nqnB (n=2) y G1nqnD (n=1) descritos previamente en Neuquén por Soriano *et al.* (2010). Los haplotipos G1nqnB y G1nqnD evidenciaron, en cada caso, la sustitución de una base con respecto a la secuencia de referencia. En el caso de G1nqnB esta sustitución de base no implicó cambios en la proteína resultante, sin embargo para el haplotipo

G1nqnD la sustitución nucleotídica se tradujo en el cambio de 1 aminoácido (Alanina por Tirosina) (Tabla 3).

Tabla 3. Haplotipos del genotipo G1 de *E. granulosus sensu stricto* encontrados en las secuencias del gen mitocondrial *cox1* de aislamientos de ganado de Neuquén

Haplotipos	Cambios en la secuencia*
G1nqn	Secuencia de referencia G1 (Bowles <i>et al.</i> , 1992)
G1nqnB	Timina x Citosina (posición 111)
G1nqnD	Guanina x Adenina (posición 136)

* En comparación del fragmento de 366 pb de la cepa G1 de referencia (Bowles *et al.*, 1992)

El índice de diversidad de los haplotipos de *E. granulosus sensu stricto* fue $0,280 \pm 0,107$ y el índice de diversidad nucleotídica fue de $0,00079 \pm 0,00032$. El índice de neutralidad de Tajima's D fue de $-0,95988$ ($p > 0,10$) y el índice de Fu's Fs fue $-1,046$ ($p > 0,10$). La figura 22 muestra la red de haplotipos construida con las secuencias analizadas.

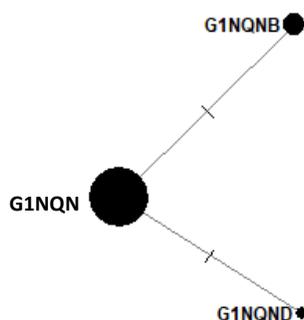


Figura 22. Red de haplotipos de las 26 secuencias parciales del gen *cox1* para *E. granulosus sensu stricto*. El tamaño de los círculos muestra la frecuencia de los haplotipos. Las líneas marcan las posiciones de las mutaciones presentes entre un haplotipo y el otro. Red de haplotipos realizada con el software NETWORK 10.0.0.0.

Para determinar los haplotipos presentes en Neuquén de *E. canadensis* G6 y G7 en distintos HI se analizaron 30 secuencias del fragmento del gen *cox1* (366 pb) que presentaban buena calidad de ADN. Se encontraron 3 haplotipos: los genotipos G6 (n=21) y G7 (n=8) descriptos originalmente por Bowles *et al.* (1992) y un nuevo haplotipo (n=1) descripto por primera vez en

este trabajo de tesis, que se denominó G7nqn01. El haplotipo G7nqn01 evidenció la sustitución de 3 bases con respecto a la secuencia de referencia, sin embargo estas sustituciones de bases no implicaron cambios en la proteína resultante.

El índice de diversidad de los haplotipos fue $0,625 \pm 0,058$ y el índice de diversidad nucleotídica fue de $0,00472 \pm 0,00067$. El índice de neutralidad de Tajima's D fue de $1,82856$ ($p > 0,10$) y el índice de Fu's F_s fue $3,348$ ($p < 0,05$). La figura 23 muestra la red de haplotipos construida con las secuencias analizadas.

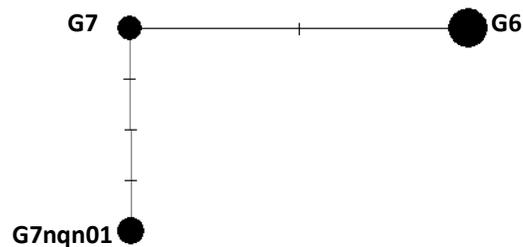


Figura 23. Red de haplotipos de las 30 secuencias parciales del gen *cox1* para *E. canadensis* G6 y G7. El tamaño de los círculos muestra la frecuencia de los haplotipos. Las líneas marcan las posiciones de las mutaciones presentes entre un haplotipo y el otro. Red de haplotipos realizada con el software NETWORK 10.0.0.0.

Las secuencias de los aislamientos de QH de caprinos y porcinos G1 y porcinos G7nqn01 de Neuquén obtenidos por primera vez en este trabajo de tesis se registraron en la base de datos de GenBank (Tabla 4).

Los árboles filogenéticos se construyeron con todas las secuencias genómicas obtenidas en el presente trabajo y los genotipos de referencia para el segmento del gen *cox1* (Figura 24).

Tabla 4. Números de acceso en GenBank de secuencias parciales del gen mitocondrial *cox1* identificadas en la provincia de Neuquén

Especie	Genotipo	Hospedador intermediario	N° total de quistes	N° de acceso
<i>E. granulosus</i> sensu stricto	G1nqn	Ovino	18	GU980906
		Caprino	2	MT796487*
		Porcino	1	MT796074*
		Bovino	10	JN176927
	G1nqnB	Ovino	2	GU980908
	G1nqnD	Ovino	1	KC954601
<i>E. canadensis</i>	G6	Caprino	27	GU980913
		Bovino	1	JN176932
	G7	Porcino	21	GU980914
	G7nqn01	Porcino	1	MT750291*

* Secuencia identificada por primera vez en el curso del presente trabajo de tesis

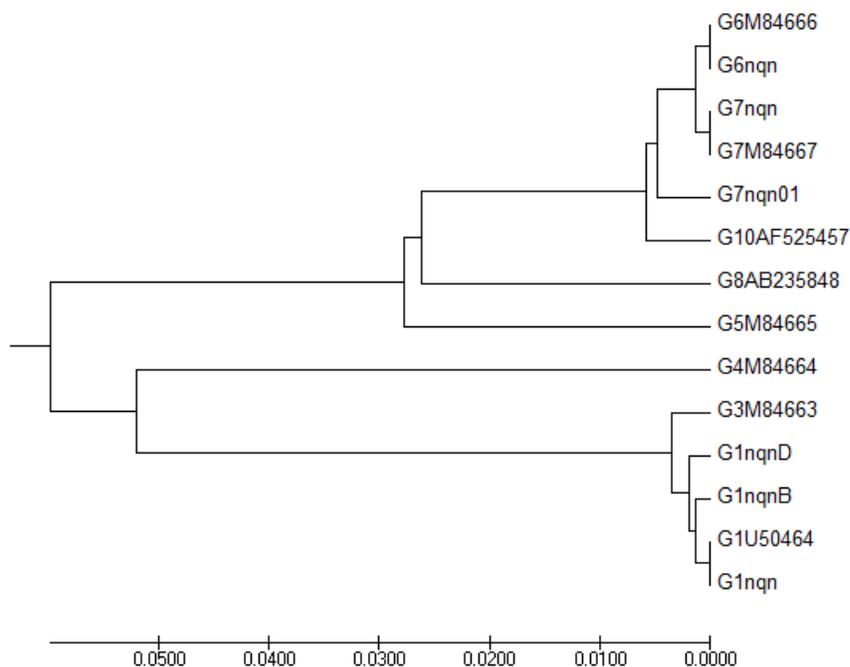


Figura 24. Árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen mitocondrial *cox1* de los aislamientos de *Echinococcus granulosus* sensu lato obtenidos en el presente estudio y con las secuencias de los genotipos de referencia de 366 pb. G1 (U50464)*, G2 a G7 (M84662 a M848667)*, G8 (AB235848)* y G10 (AF525457)*.

*Números de acceso al GenBank.

4.1.4. Evaluación de la localización anatómica de los quistes hidatídicos

La distribución de los QH en los animales y su localización anatómica se presentan en la tabla 5. Los QH de caprinos y de bovinos se localizaron mayormente en los pulmones (87,5% y 91,3%, respectivamente), mientras que el 95,8% de los QH de porcinos fueron hepáticos y los de ovinos se distribuyeron entre hígado (61,1%) y pulmón (38,9%).

Los datos de localización anatómica de los QH en los diferentes HI se analizaron mediante el test de χ^2 . Se comprobó la existencia de asociaciones significativas entre: localización pulmonar/caprinos ($\chi^2=18,00$; $p<0,0001$), localización pulmonar/bovinos ($\chi^2=15,70$; $p=0,0001$) y localización hepática/porcinos ($\chi^2=20,17$; $p<0,0001$).

Tabla 5. Distribución de los quistes hidatídicos según hospedador y localización anatómica (n=97).

Hospedador intermediario	Pulmón n (%) ¹	Hígado n (%) ¹	Totales n
Caprinos	28 (87,5%)	4 (12,5%)	32
Ovinos	7 (38,9%)	11 (61,1%)	18
Porcinos	1 (4,2%)	23 (95,8%)	24
Bovinos	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23
Totales por localización	57	40	97

1: n= número de quistes en cada localización anatómica; %= porcentaje del total de quistes en cada tipo de hospedador intermediario

4.1.5. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes

La evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los QH de diferentes HI se presenta en la tabla 6. En los caprinos el 65,6% (21/32) de los QH fue fértil con una viabilidad promedio de 64,5%. La localización de los QH fértiles fue siempre pulmonar mientras que todos los QH de caprinos que se localizaron en hígado (4/32) fueron infértiles. El 95,8% (23/24) de los QH de porcinos fue fértil y la viabilidad promedio 76,7%. El único QH pulmonar fue infértil. En los ovinos la fertilidad de los QH fue 66,7%, la viabilidad 42,1% y presentaron diferencias significativas en fertilidad según localización, siendo los QH hepáticos más fértiles que los pulmonares (10 hepáticos y 2

pulmonares) ($\chi^2= 8,04$; $p=0,0046$). Solamente el 13% (3/23) de los QH de bovinos fue fértil (2 QH pulmonares y 1 QH hepático) y la viabilidad promedio fue 28,3%.

Tabla 6. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes según el hospedador intermediario (n=97).

Hospedador intermediario	N° total de quistes	Quistes fértiles n (%) ¹	Viabilidad % \pm DE (IC 95%) ²
Caprinos	32	21 (65,6)	64,5 \pm 33,2 (50,0-79,1)
Ovinos	18	12 (66,7)	42,1 \pm 30,41 (24,9-59,3)
Porcinos	24	23 (95,8)	76,7 \pm 27,4 (65,5-87,9)
Bovinos	23	3 (13,0)	28,3 \pm 44,8 (-22,4-79,0)

1: n= número de quistes fértiles en cada tipo de hospedador intermediario; %= porcentaje del total de quistes fértiles en cada tipo de hospedador intermediario.

2: %= promedio de los porcentajes de viabilidad de los quistes fértiles; DE: desvío estándar; IC 95%= intervalo de confianza del 95%.

4.1.6. Evaluación de la relación entre el genotipo, la localización anatómica y fertilidad del QH

La distribución de los genotipos de los QH estudiados se analizó en relación a la fertilidad y la localización anatómica con el objeto de caracterizar la infección en cada tipo de HI y establecer su participación en la transmisión de la enfermedad (Tabla 7).

Los resultados mostraron que los QH fértiles correspondieron a una especie y genotipo de *E. granulosus* sensu lato para cada tipo de HI, con predominio de una localización anatómica. En los QH fértiles de caprinos se observó una asociación estadísticamente significativa entre la localización pulmonar y el genotipo *E. canadensis* G6 ($\chi^2= 5,64$; $p=0,0176$). En los QH fértiles de porcinos se observó una asociación estadísticamente significativa entre la localización hepática y el genotipo *E. canadensis* G7 ($\chi^2= 23,0$; $p<0,0001$). En los QH fértiles de ovinos se observó una asociación estadísticamente significativa entre la localización hepática y el genotipo *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1 ($\chi^2= 6,2$; $p=0,128$). En el caso de los bovinos no se observó una

asociación estadísticamente significativa ($\chi^2= 3,0$; $p=0,0833$), el 72,8% (8/11) de los QH fueron infértiles, y solamente 3 QH fueron fértiles: 2 QH correspondieron a *E. granulosus* sensu stricto G1, y 1 QH se identificó como *E. canadensis* G6. Las características predominantes de los QH por HI se presentan en la Tabla 8.

La evaluación de la relación entre haplotipo, localización anatómica y fertilidad del QH fue analizada solo en ovinos debido a que fueron los únicos HI que presentaron diversidad de haplotipos. El 83,3% (15/18) de los QH de ovinos correspondían al haplotipo G1, descrito originalmente por Bowles *et al.* (1992), y el 66,7% (10/15) de estos QH presentaba localización hepática con un 90,0% (9/10) de fertilidad. El 11,1% (2/18) de los QH de ovinos correspondían al haplotipo G1nqnB, presentaban localización pulmonar y eran infértiles, mientras que el haplotipo G1nqnD fue detectado en un QH de ovino de localización hepática e infértil.

Tabla 7. Distribución de los genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato en quistes hidatídicos provenientes de hospedadores intermediarios de Neuquén en relación a la fertilidad y la localización anatómica (n= 81).

Genotipos	Caprinos		Ovinos		Porcinos		Bovinos		Total
	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado	
	N ^a n(% fértil) ^b								
G1	-	2 0 (0,0)	7 2 (28,6)	11 10 (90,9)	1 0 (0,0)	-	9 2 (22,2)	1 0 (0,0)	31
G6	27 21 (77,8)	-	-	-	-	-	-	1 1 (100)	28
G7	-	-	-	-	-	22 22 (100,0)	-	-	22
Total	29		18		23		11		81

a: N= número de quistes en cada localización anatómica por genotipo y hospedador intermediario

b: n y %= número y porcentaje de quistes fértiles en cada localización anatómica por genotipo y hospedador intermediario

Tabla 8. Características predominantes de los quistes hidatídicos provenientes de hospedadores intermediarios de Neuquén.

Hospedador intermediario	Características predominantes		
	Localización	Fertilidad	Genotipo
Caprinos	Pulmonar	Si	G6
Ovinos	Hepática	Si	G1
Porcinos	Hepática	Si	G7
Bovinos	Pulmonar	No	G1

4.2. ESTUDIO 2: Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén.

Para realizar la caracterización de los QH se incluyeron 165 quistes provenientes de 122 pacientes de la provincia de Neuquén. Se obtuvieron QH de pacientes provenientes de todos los departamentos de la provincia de Neuquén (Figura 25). El número de casos de EQ por 100.000 habitantes de la provincia de Neuquén durante el período de enero 2013 a julio 2018 analizados en este trabajo de tesis fue de 3,9/100.000 habitantes. En la tabla 9 se muestra el número de casos de EQ por 100.000 habitantes por departamento en la provincia de Neuquén durante el



Figura 25. Localidades de procedencia de quistes hidatídicos de humanos analizados en el trabajo de tesis. AL: Aluminé; AN: Andacollo; AÑ: Añelo; BR: Buta Ranquil; CE: Centenario; CC: Cutral Có; CM: Chos Malal; EH: El Huecú; JA: Junín de los Andes; LAC: Las Coloradas; LC: Los Catutos; LL: Las Lajas; LO: Loncopué; NQ: Neuquén; PA: Piedra del Águila; PL: Picún Leufú; PLO: Plottier; RS: Rincón de los Sauces; RU: Rucachoroi; SMA: San Martín de los Andes; SP: San Patricio del Chañar; VLA: Villa La Angostura; VT: Villa Traful; ZA: Zapala.

período de estudio. No se obtuvo información sobre el departamento de procedencia de 19 pacientes. Según la información oficial obtenida durante el período de estudio, se registraron 354 denuncias de casos de EQ de la provincia de Neuquén y la IAP fue de 8,2/100.000 habitantes (Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, 2019).

Tabla 9. Número de casos por 100.000 habitantes de hidatidosis humana por departamento en la provincia de Neuquén durante el período 2013-2018. (N= 122)

Departamento	N° de casos	N° de casos por 100.000 habitantes*
Huiliches	21	24,9
Loncopué	6	15,7
Picunches	6	15,4
Aluminé	7	13,4
Minas	5	12,8
Catan Lil	1	7,1
Zapala	14	7,1
Ñorquín	2	6,8
Chos Malal	5	6,0
Collon Cura	1	4,1
Los Lagos	3	3,9
Picún Leufú	1	3,9
Añelo	2	2,8
Lacar	4	2,3
Pehuenches	3	2,0
Confluencia	22	1,1
Sin información	19	-
Total	122	

* Datos de la población obtenidos del Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020

4.2.1. Caracterización de las especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato de los quistes hidatídicos humanos

Se genotipificaron 149 QH obtenidos de 108 pacientes mediante amplificación por PCR de una fracción del gen mitocondrial que codifica para *cox1* y posterior secuenciación. Las muestras restantes no dieron PCR positiva probablemente debido a baja calidad del ADN o a que el material enviado por los cirujanos no incluía capa germinal ni PSC. El análisis de la secuencias reveló la presencia de 2 especies y 4 genotipos de *E. granulosus* sensu lato. El 59,1% (88/149) de los QH correspondieron a *E. granulosus* sensu stricto G1; el 2,7% (4/149) correspondieron a *E. granulosus* sensu stricto G3; el 37,6% (56/149) correspondieron a *E. canadensis* G6 y el 0,8% (1/149) correspondió a *E. canadensis* G7.

Los aislamientos pertenecientes a *E. granulosus* sensu stricto presentaron 5 haplotipos: los genotipos G1 y G3 descritos originalmente por Bowles *et al.* (1992), y los haplotipos G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE descritos previamente en Neuquén por Soriano *et al.* (2010) y Pierangeli (2013). Los haplotipos G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE evidenciaron, en cada caso, la sustitución de 1 base con respecto a la secuencia de referencia (Tabla 10). Estas sustituciones de bases no implicaron cambios en la proteína resultante, salvo para el haplotipo G1nqnD donde la sustitución fue no sinónima y se tradujo en el cambio de un aminoácido (Alanina por Tirosina). Las secuencias de los aislamientos de los QH se registraron en la base de datos de GenBank (Tabla 11).

Tabla 10. Haplotipos del genotipo G1 de *Echinococcus granulosus* sensu stricto encontradas en las secuencias del gen mitocondrial *cox1* de aislamientos de humanos de Neuquén.

Haplotipos	Cambios en la secuencia*
G1nqn	Secuencia de referencia G1 (Bowles <i>et al.</i> , 1992)
G1nqnC	Citosina x Timina (posición 73)
G1nqnD	Guanina x Adenina (posición 136)
G1nqnE	Timina x Citosina (posición 66)

* En comparación del fragmento de 366 pb de la cepa G1 de referencia (Bowles *et al.*, 1992)

Se detectó una coinfección con *E. granulosus* sensu stricto G1nqnD y *E. canadensis* G7 en un paciente que presentaba 3 QH en el hígado. El paciente era una mujer de 43 años de Andacollo.

Esta paciente tuvo 2 cirugías: en la primera cirugía, se removieron 2 QH que fueron caracterizados genéticamente como G1nqnD y G7; en la segunda cirugía, llevada a cabo 3 meses después, se removió un QH caracterizado como G1nqnD.

Tabla 11. Números de acceso en GenBank de secuencias parciales del gen de *cox1* mitocondrial identificadas en humanos de la provincia de Neuquén*

Especie	Genotipo	N° total de quistes	N° de acceso
	G1nqn	76	JN176931
	G1nqnC	8	KT719395
<i>E. granulosus</i> sensu stricto	G1nqnD	3	JN176930
	G1nqnE	1	MT796097
	G3nqn	4	MT796098
	G6	56	JN176934
<i>E. canadensis</i>	G7	1	JN176935

* Secuencias identificadas en el curso del presente trabajo de tesis

4.2.1.1. Distribución espacial de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato de pacientes con quistes hidatídicos de Neuquén

La distribución espacial por departamento de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato se presenta en la figura 26 y en la tabla 12. Se obtuvo información sobre la procedencia de 103 pacientes que albergaban 132 QH. En las localidades de Andacollo y Chos Malal se encontró la mayor heterogeneidad (2 especies y 3 genotipos): *E. granulosus* sensu stricto G1, *E. canadensis* G6, G7, y *E. granulosus* sensu stricto G1, G3 y *E. canadensis* G6, respectivamente. Por el contrario, el 96,8% de los QH provenientes de pacientes de Junín de los Andes correspondió al genotipo G1.



Figura 26. Distribución espacial por localidad de especies y genotipos de *Echinococcus granulosus sensu lato* identificados en pacientes de Neuquén (n=103). AL: Aluminé; AN: Andacollo; AÑ: Añelo; BR: Buta Ranquil; CE: Centenario; CC: Cutral Có; CM: Chos Malal; EH: El Huecú; JA: Junín de los Andes; LC: Los Catutos; LL: Las Lajas; LO: Loncopué; NQ: Neuquén; PA: Piedra del Águila; PLO: Plottier; RS: Rincón de los Sauces; RU: Rucachoroi; SMA: San Martín de los Andes; SP: San Patricio del Chañar; VLA: Villa La Angostura; VT: Villa Traful; ZA: Zapala. No se obtuvo PCR positiva para los quistes de pacientes que se encontraban en Catan Lil y Picún Leufú.

Tabla 12. Distribución espacial por localidad de las especies y genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato identificados en quistes hidatídicos de humanos de Neuquén (n=132).

Localidades	<i>E. granulosus</i> sensu stricto		<i>E. canadensis</i>		Total QH
	G1	G3	G6	G7	
	n (%) ^a	n (%) ^a	n (%) ^a	n (%) ^a	
Aluminé	13 (100,0)	--	--	--	13
Andacollo	4 (50,0)	--	3 (37,5)	1 (12,5)	8
Añelo	--	--	1 (100,0)	--	1
Buta Ranquil	--	--	1 (100,0)	--	1
Centenario	1 (33,3)	--	2 (66,7)	--	3
Chos Malal	2 (28,6)	4 (57,1)	1 (14,3)	--	7
Cutral Có	1 (50,0)	--	1 (50)	--	2
El Hucú	4 (80,0)	--	1 (20,0)	--	5
Junín de los Andes	29 (96,7)	--	1 (3,3)	--	30
Las Lajas	--	--	4 (100,0)	--	4
Loncopué	2 (25,0)	--	6 (75,0)	--	8
Los Catutos	--	--	2 (100,0)	--	2
Neuquén	12 (60,0)	--	9 (40,0)	--	20
Piedra del Águila	1 (100,0)	--	--	--	1
Plottier	2 (100,0)	--	--	--	2
Rincón de los Sauces	--	--	2 (100,0)	--	2
Rucachoroi	2 (100,0)	--	--	--	1
San Martín de los Andes	3 (50,0)	--	3 (50,0)	--	6
San Patricio del Chañar	1 (100,0)	--	--	--	1
Villa La Angostura	2 (100,0)	--	--	--	2
Villa Traful	--	--	1 (100,0)	--	1
Zapala	1 (10,0)	--	9 (90,0)	--	10
Total	80	4	47	1	132

a: n=número de hospedadores con el genotipo; %= porcentaje del genotipo por departamento

4.2.2. Evaluación de la microdiversidad genética y filogeografía de los haplotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato en quistes humanos de la provincia de Neuquén, utilizando la secuencia completa del gen *cox1*

La secuencia completa del gen *cox1* (1608-1609 pb) se obtuvo de 45 QH que correspondían a 41 pacientes de la provincia de Neuquén. Para este estudio sólo se incluyeron aquellos aislamientos que presentaron más de 100 ng de ADN, debido a que la secuenciación de fragmentos largos requiere ADN genómico de alta calidad. El análisis de las secuencias mostró que 26 (57,8%) quistes correspondían a *E. granulosus* sensu stricto (G1/G3) y 19 (42,2%) quistes a *E. canadensis* (G6). En aquellos pacientes que presentaban más de un QH y que se les realizó la secuenciación completa del gen *cox1* se observó un solo haplotipo.

4.2.2.1. Variabilidad genética de *Echinococcus granulosus* sensu stricto en la provincia de Neuquén

Se encontraron 9 haplotipos diferentes para los 26 QH pertenecientes a *E. granulosus* sensu stricto descritos en el ítem 4.2.2.: 12 QH presentaron una secuencia idéntica al haplotipo Eg01 previamente descrito en distintas partes del mundo (Número de acceso: JQ250806), 3 QH a EgCl01 (KX227116), 4 a EgCl03 (KX227118), 1 a EgCl20 (KX227135), 1 a Eg32 (AB688609) y 2 a EgP1 (AB522646). Tres QH fueron asignados a 3 haplotipos que se describieron por primera vez en este trabajo de tesis y se designaron EgNq01-EgNq03 (MT800795-MT800797). La distribución de los haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto en la provincia de Neuquén se muestran en la figura 27. No se pudo obtener información sobre el domicilio de un paciente.

La tabla 13 muestra la sustitución de nucleótidos para cada posición de las secuencias de 1609 pb comparado con el haplotipo de referencia Eg01. Ciertas sustituciones de nucleótidos representan sustituciones no sinónimas de aminoácidos en la proteína predicha por *cox1*.

Se compararon los haplotipos de las secuencias de 1609 pb y de 366 pb del gen *cox1* pertenecientes a *E. granulosus* sensu stricto. El fragmento de 366 pb correspondiente al haplotipo G1 originalmente descrito por Bowles *et al.* (1992) se encontró dentro de las secuencias de 1609 pb correspondientes a los haplotipos Eg01, EgCl01, Eg32, EgNq01, EgNq02 y EgNq03. El haplotipo G1nqnC de 366 pb se encontró dentro de las secuencias de 1609 pb correspondiente al haplotipo

EgCl03. Los haplotipos G1nqnD y G1nqnE de 366 pb no se encontraron dentro de ninguna de las secuencias de 1609 pb.



Figura 27. Distribución de los haplotipos de *Echinococcus granulosus* sensu stricto encontrados en 22 pacientes (n= 26) de diferentes localidades de la provincia de Neuquén: AL: Aluminé; AN: Andacollo; CC: Cutral Co; CE: Centenario; CM: Chos Malal; JA: Junín de los Andes; LO: Loncopué; NQ: Neuquén; PL: Plottier; VLA: Villa La Angostura; ZA: Zapala. El número entre paréntesis representa el número de quistes hidatídicos correspondientes a cada haplotipo.

Tabla 13. Sustitución de nucleótidos encontrados en las secuencias del gen *cox1* (1609 pb) en nueve haplotipos descritos de 26 aislamientos de *Echinococcus granulosus* sensu stricto en pacientes de Neuquén

Haplotipo	Número de acceso	Previamente descrito en	Número de aislamientos (%)	Posición del nucleótido en la secuencia completo del gen <i>cox1</i> (1609 pb)															
				105	368*	402	451*	657	717	810	817	918	1001*	1290	1324*	1432*	1536	1592*	
Eg01	JQ250806	China, Irán, Jordán, Perú, Chile (Yanagida et al. 2012; Alvarez Rojas et al. 2017)	12 (46.1)	A	C	C	C	T	C	C	T	C	T	T	T	G	C	C	
Eg32	AB688609	China (Yanagida et al. 2012)	1 (3.8)						T										
EgCl01	KX227116	Chile (Alvarez Rojas et al. 2017)	3 (11.5)											C					
EgCl03	KX227118	Chile (Alvarez Rojas et al. 2017)	4 (15.3)	G		T					C								
EgCl20	KX227135	Chile (Alvarez Rojas et al. 2017)	1 (3.8)		T ¹							T							
EgP1	AB522646	Nepal (Yamasaki et al. 2016, sin publicar)	2 (7.6)							T			C ²				T	T ³	
EgNq01	MT800795	Este estudio	1 (3.8)												C ⁴				
EgNq02	MT800796	Este estudio	1 (3.8)					C											
EgNq03	MT800797	Este estudio	1 (3.8)				A ⁵										A ⁶		

* Sustituciones no sinónimas de aminoácidos:

¹ Sustitución de aspartato por valina

² Sustitución de valina por alanina

³ Sustitución de leucina por valina

⁴ Sustitución de serina por arginina

⁵ Sustitución de leucina por histidina

⁶ Sustitución de valina por isoleucina

4.2.2.2. Red de haplotipos, Índices de diversidad y neutralidad de *Echinococcus granulosus sensu stricto*

La red de haplotipos construida con las secuencias completas del gen *cox1* para 26 quistes se muestra en la figura 28.

El índice de diversidad de los haplotipos de *E. granulosus sensu stricto* fue $0,766 \pm 0,076$ y el índice de diversidad nucleotídica fue de $0,00134 \pm 0,00026$. El índice de neutralidad de Tajima's D fue de $-1,56926$ ($p > 0,1$) y el índice de Fu's Fs fue $-2,239$ ($p > 0,1$).

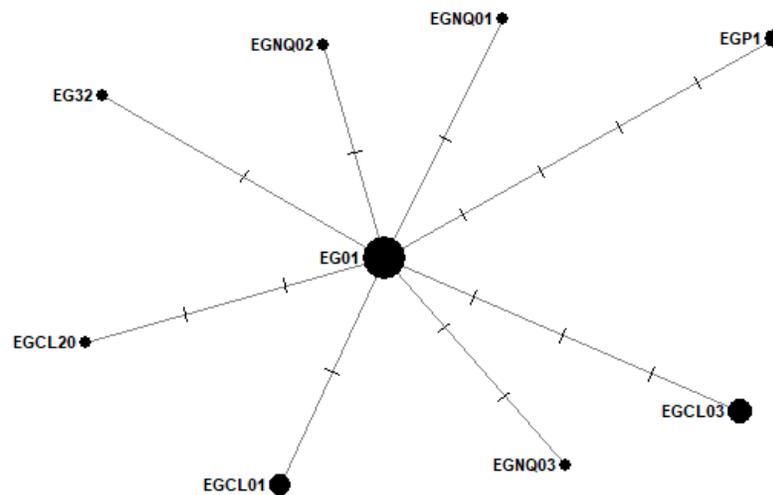


Figura 28. Red de haplotipos de las 26 secuencias completas del gen *cox1* para *Echinococcus granulosus sensu stricto*. El tamaño de los círculos muestra la frecuencia de los haplotipos. Las líneas marcan las posiciones de las mutaciones presentes entre haplotipos. Red de haplotipos realizada con el software NETWORK 10.0.0.0.

Se construyó una red de haplotipos utilizando las secuencias de 1609 pb de haplotipos encontrados en pacientes de la provincia de Neuquén ($n = 26$) y secuencias de haplotipos encontrados en Chile ($n = 109$), en Perú ($n = 48$) y en Bolivia ($n = 29$) (Figura 29). El índice de diversidad de los haplotipos de *E. granulosus sensu stricto* fue $0,963 \pm 0,14$ y el índice de diversidad nucleotídica fue de $0,00195 \pm 0,00017$. El índice de neutralidad de Tajima's D fue de $-2,35035$ ($p < 0,01$) y el índice de Fu's Fs fue $-65,567$ ($p < 0,02$), ambos índices fueron estadísticamente significativos.

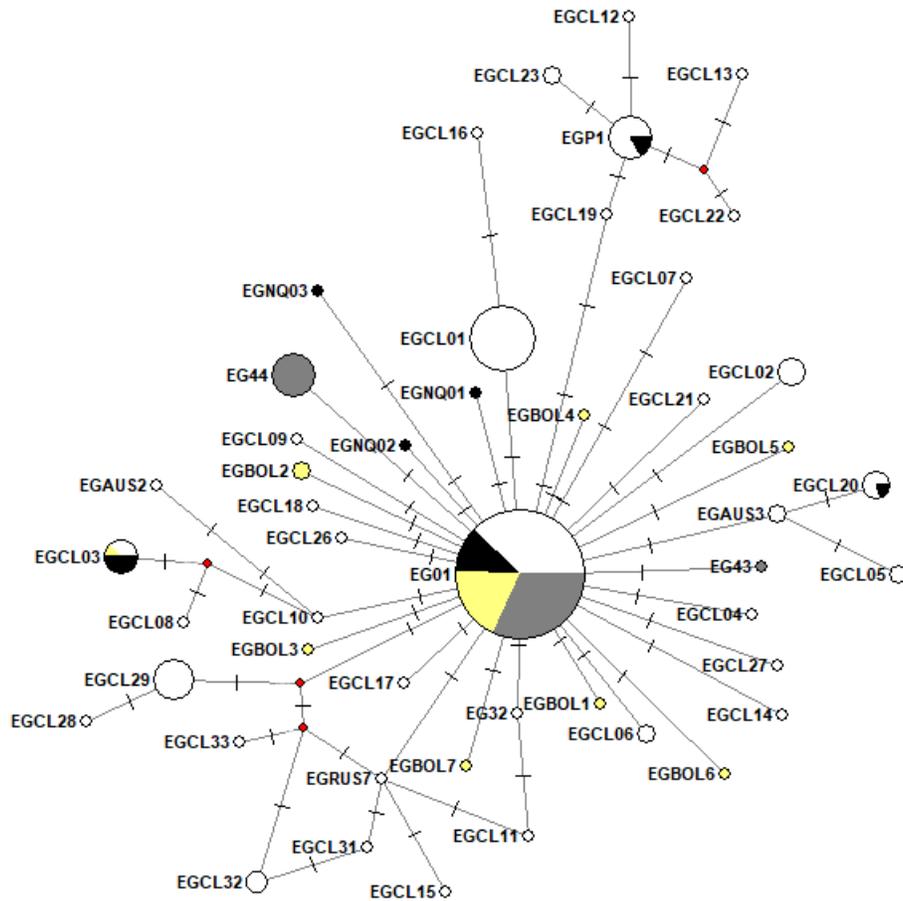


Figura 29. Red de haplotipos construida con secuencias completas del gen *cox1* de *Echinococcus granulosus* sensu stricto encontradas en el presente trabajo de tesis (n= 26) y secuencias descritas en Chile (n= 109), Perú (n= 48) y Bolivia (n= 29). El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias en las que se ha identificado cada haplotipo. Las líneas marcan las posiciones de las mutaciones presentes entre haplotipos. La fracción de haplotipos encontrados en este estudio está codificada en negro, mientras que los haplotipos encontrados en Chile están codificados en blanco, los haplotipos de Bolivia en amarillo y los haplotipos de Perú están codificados en gris. Los círculos en rojo marcan un haplotipo hipotético faltante. Números de acceso de los haplotipos: EGNQ01-EGNQ03 (MT800795-MT800797), EG01 (JQ250806), EGP1 (B522646), EGAUS02 (KT968703), EGAUS03 (KT968704), EGRUS7 (AB777904), EGCL01-EGCL21 (KX227116-KX227136, respectivamente), EGCL23-EGCL27 (MK139300-MK139304, respectivamente), EGCL28-EGCL29 (MK399399-MK399400), EGCL31-EGCL33 (MK399401-MK399403), EG43 (AB688620), EG44 (AB688621), EGBOL1-EGBOL7 (MT072973). Red de haplotipos realizada con el software NETWORK 10.0.0.0.

4.2.2.3. Haplotipos de *Echinococcus canadensis* en la provincia de Neuquén

Se encontraron 7 haplotipos para los 19 QH pertenecientes a *E. canadensis* G6 descritos en el ítem 4.2.3.: 13 QH correspondían al haplotipo Ec01 previamente descrito en Kenia (Número de acceso: KX010830) y 1 QH a Ec22 (KX010851) descrito en Sudan. Cinco QH fueron asignados a 5 haplotipos que se describieron por primera vez en este trabajo de tesis y se designaron EcNq01-EcNq05 (Número de acceso: MT800779-MT800783). La distribución de los haplotipos de *E. canadensis* G6 en la provincia de Neuquén se muestran en la figura 30. No se obtuvo información sobre el domicilio de 2 pacientes que presentaban QH con haplotipo EcNq02 y Ec01, respectivamente.

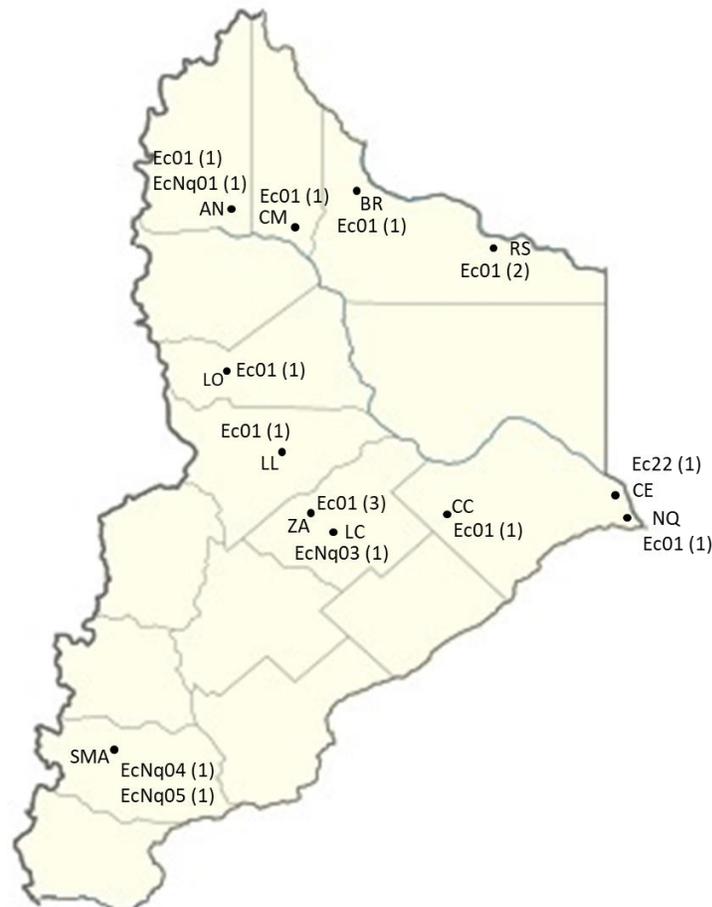


Figura 30. Distribución de los haplotipos de *Echinococcus canadensis* encontrados en 19 pacientes (n= 19) de diferentes localidades de la provincia de Neuquén: AN: Andacollo; BR: Buta Ranquil; CC: Cutral Co; CE: Centenario; CM: Chos Malal; LC: Los Catutos; LL: Las Lajas; LO: Loncopué; NQ: Neuquén; RS: Rincón de los Sauces; SMA: San Martín de los Andes; ZA: Zapala. El número entre paréntesis representa el número de quistes hidatídicos correspondientes a cada haplotipo.

La tabla 14 muestra la sustitución de nucleótidos para cada posición de la secuencia de 1608 pb comparada con el haplotipo de referencia Ec01. Ciertas sustituciones representan sustituciones no sinónimas de aminoácidos en la proteína predicha por *cox1*.

Tabla 14. Sustitución de nucleótidos encontrados en las secuencias del gen *cox1* (1608 pb) en nueve haplotipos descritos de 19 aislamientos de *Echinococcus canadensis* en Neuquén.

Haplotipo	Número de acceso	Previamente descrito en	Número de aislamientos (%)	Posición del nucleótido en la secuencia completo del gen <i>cox1</i> (1609 pb)					
				127*	257*	473*	596*	646	648*
Ec01	AB688142; AB813183; AB893253; KX010830	Russia, Mongolia, Kenya (Addy <i>et al.</i> , 2017)	13 (68.4)	A	T	G	T	T	T
Ec22	KX010851	Sudan (Addy <i>et al.</i> , 2017)	1 (5.3)						
EcNq01	MT800779	Este estudio	1 (5.3)						G ¹
EcNq02	MT800780	Este estudio	1 (5.3)				G ²		
EcNq03	MT800781	Este estudio	1 (5.3)					G	
EcNq04	MT800782	Este estudio	1 (5.3)	C ³	C ⁴				
EcNq05	MT800783	Este estudio	1 (5.3)			C ⁵			

* Sustituciones no sinónimas de aminoácidos:

¹ Sustitución de cisteína por triptófano

² Sustitución de leucina por triptófano

³ Sustitución de asparagina por histidina

⁴ Sustitución de leucina por serina

⁵ Sustitución de arginina por treonina

4.2.2.4. Red de haplotipos, índices de diversidad y neutralidad de *Echinococcus canadensis*

La red de haplotipos construida con las secuencias del gen *cox1* para 19 quistes obtenidos en Neuquén se muestra en la figura 31.

El índice de diversidad de los haplotipos de *E. canadensis* fue $0,544 \pm 0,136$ y el índice de diversidad nucleotídica fue $0,00046 \pm 0,00015$. El índice de neutralidad de Tajima's D fue $-2,10998$ ($p < 0,05$) y el índice de Fu's Fs fue $-4,895$ ($p < 0,02$).

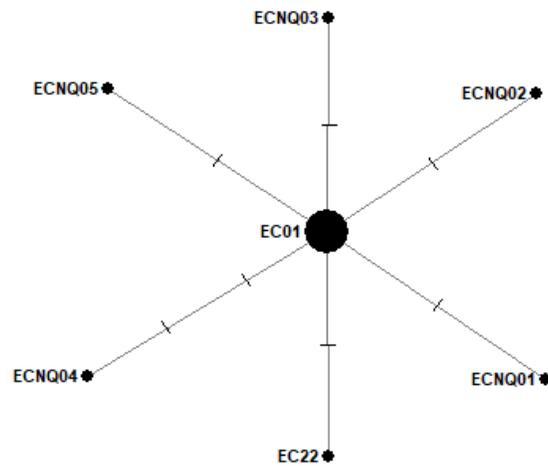


Figura 31. Red de haplotipos de las 19 secuencias completas del gen *cox1* para *Echinococcus canadensis* encontradas en la provincia de Neuquén. El tamaño de los círculos muestra la frecuencia de los haplotipos. Las líneas marcan las posiciones de las mutaciones presentes entre un haplotipo y el otro. Red de haplotipos realizada con el software NETWORK 10.0.0.0.

Se construyó una red de haplotipos utilizando las secuencias de 1608 pb de haplotipos de *E. canadensis* G6 encontrados en la provincia de Neuquén y en Genbank para aumentar el número de secuencias en la red de haplotipos y así posicionar la provincia de Neuquén en un contexto geográfico más amplio, debido a que hay pocos reportes de haplotipos de *E. canadensis* G6 descritos en América del Sur. La red de haplotipos se construyó con las secuencias completas del gen *cox1* de 355 aislamientos de *E. canadensis* G6 (Figura 32).

4.2.3. Descripción de los ciclos de transmisión de *Echinococcus granulosus* sensu lato en ganado y humanos de la provincia de Neuquén

La distribución espacial por departamento de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato de QH de ganado (n= 81) y de humanos (n= 149) se presenta en la figura 33. La mayor diversidad de genotipos se encontró en los departamentos de Minas y Chos Malal con: *E. granulosus* sensu stricto G1 en ovinos y humanos, *E. canadensis* G6 en caprinos y humanos, G7 en humanos; y *E. granulosus* sensu stricto G1 en bovinos y caprinos, G3 y *E. canadensis* G6 en humanos, respectivamente. En el departamento de Confluencia se encontró que el genotipo *E. granulosus* sensu stricto G1 infecta a humanos, ovinos y porcinos, mientras que en Aluminé este genotipo infecta a humanos y bovinos. En el norte de la provincia también se detectaron ciclos simultáneos de G1: en ovinos y humanos del departamento de Minas, en caprinos y bovinos de Chos Malal. Se detectaron ciclos simultáneos de *E. canadensis* G6 en los departamentos de Minas (en caprinos y humanos), de Chos Malal (en bovinos, caprinos y humanos) y de Pehuenches (en caprinos y humanos).

Los haplotipos G1 original y G1nqnD del fragmento de 366 pb fueron encontrados en este trabajo de tesis en ganado y en humanos de la provincia de Neuquén. El análisis de la distribución de estos haplotipos en ganado y humanos mostró ciclos simultáneos del haplotipo *E. granulosus* sensu stricto G1 original descrito por Bowles *et al.* (1992) en: Minas (humanos y ovinos), en Aluminé (bovinos y humanos) y en Confluencia (humanos, porcinos y ovinos). No se detectaron ciclos simultáneos de los haplotipos con escaso número de aislamientos (G1nqnB, G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE).

De acuerdo a la fertilidad de los QH de los distintos HI analizadas en el ítem 4.1.6. tabla 7 se determinó que existen ciclos activos en distintos departamentos de la provincia de Neuquén. Estos ciclos activos incluyen al humano como hospedador sin salida. Se detectó un ciclo activo en ovinos infectados con el haplotipo de *E. granulosus* sensu stricto G1 original descrito por Bowles *et al.* (1992) en Confluencia, departamento donde se detectaron todos los ovinos con QH hepáticos fértiles. Además, se detectaron ciclos activos de *E. canadensis* G6 en caprinos con QH pulmonares fértiles en los departamentos de

Minas, Chos Malal y Pehuenches y en porcinos infectados con G7 con QH hepáticos fértiles en el departamento de Confluencia.



Figura 33. Distribución espacial por localidad de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato de aislamientos de ganado (n= 81) y humanos (n= 149) de Neuquén. 1: Minas; 2: Chos Malal; 3: Pehuenches; 4: Ñorquín; 5: Loncopué; 6: Añelo; 7: Picunches; 8: Zapala; 9: Confluencia; 10: Aluminé; 11: Huiliches; 12: Collón Curá; 13: Lácar; 14: Los Lagos.

4.2.4. Características clínicas de los pacientes: distribución de casos por edad y sexo

La distribución de edad y sexo y la proporción de hombres/mujeres por grupo de edades se muestra en la tabla 15. Se obtuvo información de la edad de 119 pacientes. La edad de los pacientes con hidatidosis osciló de 3 a 81 años y la edad promedio fue de $34,73 \pm 21,03$ años (mediana: 32 años; IC 95%: 30,91-38,55 años). El 30,2% (36/119) de los casos fueron niños menores de 18 años; la edad promedio de estos pacientes fue de $11,4 \pm 4,5$

años (mediana: 12 años; IC 95%: 9,85-12,87 años). La edad promedio de los pacientes adultos fue de $44,90 \pm 16,86$ años (mediana: 43 años; IC 95%: 41,19-48,55 años). Los grupos de edades 10-18 y 28-36 años fueron los más afectados y representaron 19,3% y 15,1% respectivamente del número total casos. Los pacientes de edades mayores a 55 años fueron menos afectados: 55-63 años (7,5%) y 73-81 años (4,2%).

Tabla 15. Distribución por edad y sexo de pacientes con hidatidosis de Neuquén (n= 119)

Edad	Hombres		Mujeres		Ambos		Proporción Hombres/ Mujeres
	N	%	N	%	N	%	
1-9	10	14,5	3	6,0	13	10,9	3,3
10-18	21	30,4	2	4,0	23	19,3	10,5
19-27	8	11,6	4	8,0	12	10,1	2,0
28-36	6	8,7	12	24,0	18	15,1	0,5
37-45	5	7,3	11	22,0	16	13,4	0,3
46-54	5	7,3	8	16,0	13	10,9	0,5
55-63	4	5,8	5	10,0	9	7,6	0,8
64-72	7	10,1	3	6,0	10	8,4	2,3
73-81	3	4,3	2	4,0	5	4,2	1,5
Total	69	100	50	100	119	100	

Los hombres representaron el 58,2% (71/122) de los casos totales. No se observaron diferencias significativas entre pacientes masculinos y femeninos totales ($\chi^2= 3,28$; $p= 0,0702$). Sin embargo, cuando se analizaron los casos en función de la edad, en los casos pediátricos los varones representaron el 86,1% (31/36) observándose una diferencia significativa con las niñas ($\chi^2= 18,78$; $p<0,0001$). No se observaron diferencias significativas entre hombre y mujeres adultos ($\chi^2= 0,42$; $p= 0,5176$).

4.2.4.1. Relación entre genotipo y las características clínicas del paciente

El genotipo G1 infectó al 67,6% (23/34) de los pacientes menores de 18 años y al 44,5% (33/74) de los adultos. Se observó mayor cantidad de pacientes menores de 18 años infectados con el genotipo G1, presentando diferencias significativas con el genotipo G6 ($\chi^2= 7,71$; $p<0,005$). El único caso de G3 correspondió a un paciente adulto, al igual que la coinfección con G1 y G7. El 32,4% (11/34) de los casos en menores de 18 años correspondió al genotipo G6, mientras que en adultos fue de 52,7% (39/74). Se observaron diferencias significativas entre niños y adultos infectados con el genotipo G6 ($\chi^2= 15,68$; $p= 0,0001$).

En la tabla 16 se muestra la distribución del sexo y grupo etario de los paciente en función del genotipo de el/los QH. El genotipo G1 infectó al 42,8% (18/42) de las mujeres y al 57,6% (38/66) de los hombres. Se observaron diferencias significativas entre sexo femenino y masculino infectados con el genotipo G1 ($\chi^2= 7,14$; $p= 0,0075$). El único caso de G3 correspondió a un hombre adulto, representando el 1,5% (1/66) sobre el total de hombres. El genotipo G6 infectó al 54,8% (23/42) de las mujeres y al 40,9% (27/66) de los hombres. No se observaron diferencias significativas entre sexo femenino y masculino infectados con el genotipo G6 ($\chi^2= 0,32$; $p= 0,5714$). El único caso de coinfección con G1 y G7 correspondió a una mujer, representando el 2,4% (1/42) sobre el total de mujeres. No hubo casos de niñas infectadas con genotipo G6.

Tabla 16. Distribución del sexo y grupo etario de los paciente en función del genotipo de el/los quistes

	Femenino (n=42)			Masculino (n=66)		
	Niñas	Adultos	Total	Niños	Adultos	Total
	n (%) ^a	n (%) ^a	Femenino	n (%) ^a	n (%) ^a	Masculino
G1	5 (27,8)	13 (72,2)	18	18 (47,4)	20 (52,6)	38
G3	--	--	0	0	1 (100,0)	1
G6	0 (0,0)	23 (100,0)	23	11 (40,7)	16 (59,3)	27
G1/G7	0 (0,0)	1 (100,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0
Total	5	37	42	29	37	66

a: número y porcentaje de pacientes en cada grupo etario por genotipo y sexo

4.2.5. Evaluación de la localización anatómica de los quistes hidatídicos humanos

El análisis de la localización anatómica de los QH mostró que en el 95,1% (116/122) de los casos, un solo órgano fue afectado. El hígado fue la localización más frecuente con 45,9% de los casos como sitio único de infección, de 3,3% en combinación con peritoneo y de 1,6% en combinación con pulmón (Tabla 17). La segunda localización más frecuente fueron los pulmones con 37,8% de los casos como sitio único de infección. La relación hígado/pulmón fue 1,3/1. Además, se observaron QH en localizaciones anatómicas poco frecuentes como hueso (fémur y vértebras), bazo, riñón, peritoneo, retroperitoneo, cerebro, páncreas y localización extrapleural.

Tabla 17. Frecuencia de localización anatómica de quistes hidatídicos en humanos de Neuquén (n=122)

Localización	Número de casos	% del total
Hepática	56	45,9
Pulmonar	46	37,8
Hepática + peritoneal	4	3,3
Ósea (Vertebra)	3	2,5
Renal	3	2,5
Hepática + pulmonar	2	1,6
Retroperitoneal	2	1,6
Peritoneal	1	0,8
Pancreática	1	0,8
Cerebral	1	0,8
Esplénica	1	0,8
Extrapleural	1	0,8
Ósea (Fémur)	1	0,8
Total	122	100,0

4.2.5.1. Relación entre genotipo y localización anatómica de los quistes hidatídicos

La distribución de los genotipos de *E. granulosus* sensu lato según la localización anatómica se presenta en la tabla 18. El 69,7% (53/76) de los QH hepáticos correspondieron a *E. granulosus* sensu stricto G1, mientras que el 60,4% (29/48) de los QH pulmonares correspondieron a *E. canadensis* G6. Se observaron diferencias significativas en las localizaciones anatómicas hepática y pulmonar en función del genotipo ($\chi^2= 14,7$; $p<0,0001$). Para el genotipo *E. granulosus* sensu stricto G1 la relación hígado/pulmón fue 2,8/1 y se comprobó la existencia de asociaciones significativas entre localización hepática/genotipo G1 ($\chi^2= 17,25$; $p<0,0001$). Para el genotipo *E. canadensis* G6 la relación hígado/pulmón fue 0,6/1 y se comprobó la existencia de asociaciones significativas entre localización pulmonar/genotipo G6 ($\chi^2= 5,15$; $p= 0,0232$). También se observaron diferencias significativas cuando se analizó los QH G6 en función de la localización hepática (n=18) y extrahepática (n=38) ($\chi^2= 10,79$; $p=0,001$).

Tabla 18. Distribución de genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato de acuerdo a la localización anatómica de QH en humanos (n=149)

Localización	<i>E. granulosus sensu stricto</i>		<i>E. canadensis</i>		Total
	G1	G3	G6	G7	
Hepática	53	4	18	1	76
Pulmonar	19	-	29	-	48
Vertebral	9	-	2	-	11
Peritoneal	5	-	1	-	6
Retroperitoneal	2	-	-	-	2
Renal	-	-	2	-	2
Pancreática	-	-	1	-	1
Cerebral	-	-	1	-	1
Esplénica	-	-	1	-	1
Extrapleural	-	-	1	-	1
Total	88	4	56	1	149

4.2.6. Evaluación del número de quistes hidatídicos por paciente

El número total de QH detectados en los pacientes fue 165 y la intensidad de la infección (cantidad de QH por persona) varió en un rango entre 1 a 6; la media fue $1,35 \pm 0,8$ QH, mediana: 1, IC 95%= 1,20-1,50. El 76,2% (93/122) de los pacientes presentaba un solo QH; el 18,0% (22/122) 2 QH; el 2,5% (3/122) 3 QH; el 1,7% (2/122) 4 QH; el 0,8% (1/122) 5 QH y el 0,8% (1/122) 6 QH.

4.2.6.1. Relación entre genotipo y número de quistes hidatídicos

El gráfico de la figura 34 muestra la relación entre el genotipo y el número de QH por paciente. Para este análisis se incluyeron 108 pacientes. Los pacientes infectados con G1 presentaron hasta 6 QH, mientras que pacientes infectados con G6 presentaron solamente hasta dos QH. Se observaron diferencias significativas en el número de QH entre los genotipos G1 y G6 ($\chi^2= 9,05$; $p=0,0026$). El 62,5% (35/56) de los pacientes infectados con G1 presentaban un solo QH; el 28,6% (16/56) 2 QH; el 3,6% (2/56) 3 QH; el 1,8% (1/56) 4 QH; el 1,8% (1/56) 5 QH y el 1,8% (1/56) 6 QH. El 88,0% (44/50) de los pacientes infectados con G6 presentaba un solo QH y el 12,0% (6/50) 2 QH. El único paciente infectado con G3 presentó 4 QH, mientras que el paciente con coinfección con G1 y G7 presentó 3 QH.

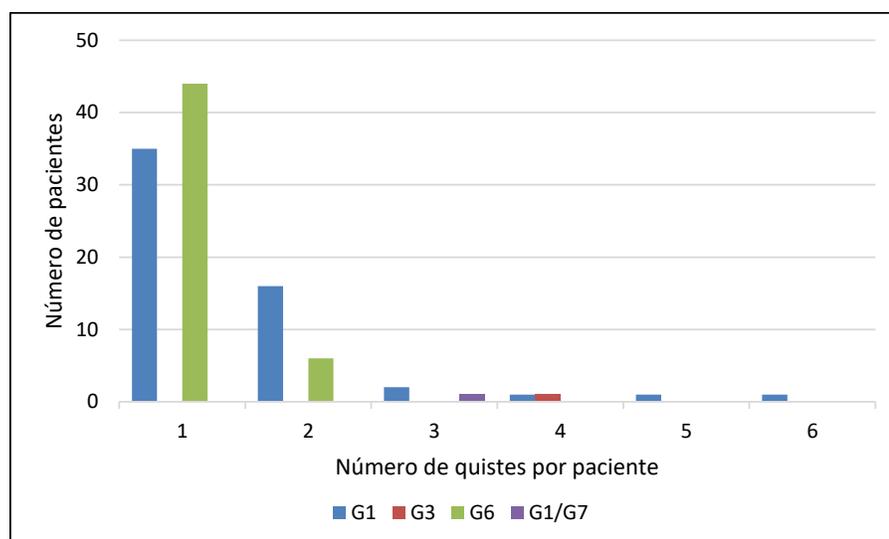


Figura 34. Distribución de pacientes analizados en función del genotipo y el número de QH por paciente (n= 108)

4.2.7. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes hidatídicos

Fue posible determinar la fertilidad de 162 QH de 102 pacientes. El 61,7% (100/162) de los QH humanos fue fértil; la viabilidad promedio de los mismos fue $48,5\% \pm 33,1$, IC: 35,63-61,30 y el rango fue 0-98%. El porcentaje de fertilidad y viabilidad promedio de los QH de acuerdo a la localización se presenta en la tabla 19. No se observaron diferencias significativas entre la fertilidad de los QH hepáticos y pulmonares ($\chi^2= 0,06$; $p= 0,8094$).

Tabla 19. Evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los quistes según la localización anatómica del quiste hidatídico (n=162)

Localización	N° total de quistes	Quistes fértiles n (%) ¹	Viabilidad % \pm DE (IC 95%) ²
Hepática	84	56 (66,7)	$66,2 \pm 23,7$ (51,73-80,73)
Pulmonar	51	34 (66,7)	$37,5 \pm 34,2$ (15,74-59,26)
Ósea (vertebra)	11	1 (9,1)	0 _3
Peritoneal	6	2 (33,3)	$20,5 \pm 27,6$ _3
Renal	3	3 (100)	0
Retroperitoneal	2	2 (100)	$5,0 \pm 0$ _3
Esplénica	1	1 (100)	0
Pancreática	1	0 (0)	_4
Cerebral	1	0 (0)	_4
Extrapleural	1	1 (100)	0
Ósea (Fémur)	1	0 (0)	_4

1: n= número de quistes fértiles en cada localización anatómica; %= porcentaje del total de quistes en cada localización anatómica.

2: %= promedio de los porcentajes de viabilidad de los quistes fértiles; DE: desvío estándar; IC 95%= intervalo de confianza del 95%.

3: en los caso que el n fue menor o igual a 2 no se calculó el IC

4: No se calcularon los parámetros de DE e IC debido que la fertilidad fue 0

4.2.7.1. Relación entre genotipo y fertilidad de quistes hidatídicos

La distribución de los genotipos de los QH estudiados se analizó en relación a la fertilidad y las localizaciones anatómicas más frecuentes: hepática, pulmonar, vertebral y peritoneal (Tabla 20). No se observaron diferencias significativas entre la fertilidad de los genotipos G1, G3 y G6 ($\chi^2= 1,13$; $p= 0,5691$).

Tabla 20. Distribución de los genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato de quistes hidatídicos de humanos de Neuquén en relación a la fertilidad y la localización anatómica (n= 141)

Genotipos	Hígado	Pulmón	Vértebra	Peritoneo	Total QH
	N ^a				
	(n;% fértil) ^b				
G1	53	19	9	5	86
	38 (71,7)	13 (68,4)	1 (11,1)	2 (40,0)	54 (62,7)
G3	4	--	--	--	4
	3 (75,0)				3 (75,0)
G6	18	29	2	1	50
	14 (77,8)	21 (72,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	35 (70,0)
G7	1	--	--	--	1
	0 (0,0)				0 (0,0)
Total QH	76	48	11	6	141

a: N= número de quistes en cada localización anatómica por genotipo

b: n y %= número y porcentaje de quistes fértiles en cada localización anatómica por genotipo

4.2.7.2. Tratamiento farmacológico de los pacientes

Se pudo registrar información acerca del tratamiento previo solamente en 82 pacientes. Dentro de este grupo, el 51,2% (42/82) de los pacientes recibió tratamiento farmacológico antes de la cirugía, efectuado siempre con ABZ. La dosis de ABZ fue de 10 mg/kg/día para pacientes con quistes en hígado. Los tratamientos fueron prescritos por 1 a 304 días antes de la cirugía, con promedio de 27,9 días. Los pacientes tratados

presentaron QH en las siguientes localizaciones anatómicas: 23 en hígado (54,8%), 3 en hígado y peritoneo (7,1%), 12 en pulmones (28,6%), 3 en vértebras (7,1%) o 1 riñón (2,4%).

Se analizó la fertilidad de los quistes de los pacientes tratados con ABZ y se observó que el 64,3% (27/42) de los pacientes presentaban quistes fértiles. El 37,0% (10/27) de los quistes fértiles en pacientes tratados con ABZ presentaban quistes viables, con un rango de 2,0 a 98,0%. La viabilidad de los QH en función de la cantidad de días de tratamiento que recibieron los pacientes se muestra en la tabla 21. Aquellos pacientes con QH fértiles tratados durante más de 20 días presentaban quistes inviables.

Tabla 21. Viabilidad de acuerdo a la duración del tratamiento farmacológico en pacientes con hidatidosis

Días de tratamiento	Nº de pacientes con QH fértiles	Nº de pacientes con QH viables	Viabilidad promedio (%)	Rango de viabilidad (%)
1	2	0	0	0
2	8	4	75,75	50,0-98,0
3	1	0	0	0
4	1	1	80,0	80,0
6	3	2	41,0	2,0-80,0
7	1	0	0	0
8	1	1	40,0	40,0
10	1	1	40,0	40,0
14	2	0	0	0
15	1	1	70,0	70,0
> 20	6	0	0	0
Total	27	10	31,52	0-98,0

4.2.8. Evaluación del tamaño y crecimiento de los quistes hidatídicos

El tamaño de los QH se determinó por la medida del diámetro mayor, disponible para 141 QH. El tamaño varió entre 0,3 cm y 20 cm, el diámetro mayor promedio fue de 7,4 ± 4,4 cm, mediana: 6,5 cm, IC 95%: 6,64-8,45 cm. El tamaño de los QH en las localizaciones anatómicas más frecuentes (hepática, pulmonar, ósea vertebral y peritoneal) se muestra

en la tabla 22. El único QH cerebral presentaba un diámetro mayor de 10 cm, mientras que el diámetro mayor del único QH extrapleurales (paravertebral) fue 7,6 cm.

La velocidad de crecimiento de los QH hepáticos y pulmonares se estimó mediante la variación del diámetro mayor de todos los QH hepáticos y pulmonares detectados en función del grupo etario de los pacientes (Figura 35). Para realizar este análisis se armaron 5 grupos etarios de 18 años cada uno, donde el grupo etario 1 corresponde a pacientes pediátricos y los grupos etarios 2, 3, 4 y 5 corresponden a pacientes adultos. El promedio de las medidas del diámetro mayor de los QH hepáticos varió en forma lineal con el grupo etario de los pacientes ($R^2=0,8328$), mostrando correlación positiva fuerte. El promedio de las medidas del diámetro mayor de los QH pulmonares presentó una relación positiva moderada con el grupo etario de los pacientes ($R^2=0,4993$).

Tabla 22. Medida del diámetro mayor de los quistes en las localizaciones anatómicas más frecuentes (n= 134)

Localización	N° total de quistes	X ± DE (IC 95%) ^a	Rango (cm)
Hepática	73	7,98 ± 4,5 (6,93-9,04)	0,5 – 20,0
Pulmonar	45	7,64 ± 3,58 (6,56-8,71)	2,5 – 15,0
Ósea vertebral	10	0,46 ± 0,08 (0,40-0,52)	0,3 – 0,5
Peritoneal	6	5,28 ± 2,97 (2,17-8,40)	3,0 – 10,0

a: X= promedio del diámetro mayor de los quistes (cm); DE: desvío estándar (cm); IC 95%= intervalo de confianza del 95% (cm).

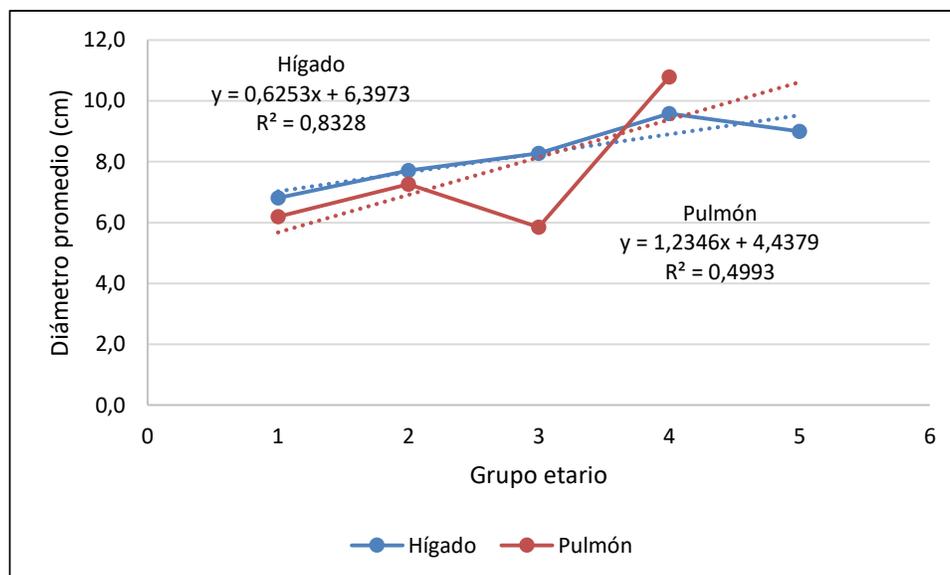


Figura 35. Variación de las medidas promedio del diámetro mayor de quistes hepáticos y pulmonares en función del grupo etario del paciente. (R^2 : coeficiente de regresión lineal; Grupo etario 1 (pacientes pediátricos): 1-18; 2: 19-37; 3: 38-56; 4: 57-75; 5: 76-81). No se encontraron quistes pulmonares en el grupo etario 76-81. La línea punteada indica la línea de tendencia.

4.2.8.1. Relación entre genotipo, tamaño del quiste y edad del paciente

El análisis del diámetro de los quistes en relación al genotipo mostró que el promedio de diámetro de los quistes de *E. granulosus* sensu stricto G1 (n=63) fue $7,4 \pm 4,94$ cm (mediana: 6,9; I.C.: 6,29-8,51 cm; Rango: 0,5-20 cm), de *E. granulosus* sensu stricto G3 (n=4) fue $11,0 \pm 6,3$ cm (mediana: 10; I.C.: 0,92-20,98 cm; Rango: 4,3-19,5 cm), de *E. canadensis* G6 (n=39) fue $7,4 \pm 3,97$ cm (mediana: 6,45; I.C.: 6,22-8,57 cm; Rango: 0,3-17,0 cm) y el único quiste de *E. canadensis* G7 fue 0,5 cm.

La tabla 23 muestra la relación entre el diámetro de los quistes de las localizaciones más frecuentes (hígado y pulmón) y los genotipos G1 y G6. El rango de los quistes hepáticos G1 (n=47) fue de 0,5-20,0 cm, para los quistes pulmonares G1 (n=16) fue de 2,5-15,0 cm, para los quistes hepáticos G6 (n=14) fue 2,0-15,5 cm y para los quistes pulmonares G6 (n=25) fue 3,0-15,0 cm. No se observaron diferencias significativas en el diámetro de los quistes hepáticos G1 y G6 ($p=0,7560$). Tampoco se observaron diferencias significativas en el diámetro de los quistes pulmonares G1 y G6 ($p=0,0959$).

La velocidad de crecimiento de los QH hepáticos y pulmonares de acuerdo al genotipo se estimó mediante la variación del diámetro mayor de todos los QH hepáticos y pulmonares de genotipo G1 y G6, en función del grupo etario de los pacientes. El promedio de las medidas del diámetro mayor de los QH hepáticos G1, varió en forma lineal con el grupo etario de los pacientes ($R^2=0,851$), mostrando correlación positiva. El promedio de las medidas del diámetro mayor de los QH hepáticos G6, presentó una correlación lineal moderada con el grupo etario de los pacientes ($R^2=0,6932$).

El promedio de las medidas del diámetro mayor de los QH pulmonares G1, indicó una correlación lineal fuerte con el grupo etario de los pacientes ($R^2=0,9911$), mostrando correlación positiva (Figura 36). El promedio de las medidas del diámetro mayor de los QH pulmonares G6 presentó una correlación lineal moderada con el grupo etario de los pacientes ($R^2=0,436$) (Figura 37).

Tabla 23. Medida del diámetro mayor del quiste en función de la localización y el genotipo (n= 102)

	<i>E. granulosus</i> sensu stricto G1	<i>E. canadensis</i> G6
	X ± DE (IC 95%) ^a	X ± DE (IC 95%) ^a
Hepática	8,0 ± 4,7 (6,58-9,32)	8,4 ± 3,7 (6,24-10,52)
Pulmonar	8,9 ± 3,9 (6,84-11,01)	6,9 ± 3,4 (5,54-8,36)

a: X= promedio del diámetro mayor de los quistes (cm); DE: desvío estándar (cm); IC 95%= intervalo de confianza del 95% (cm).

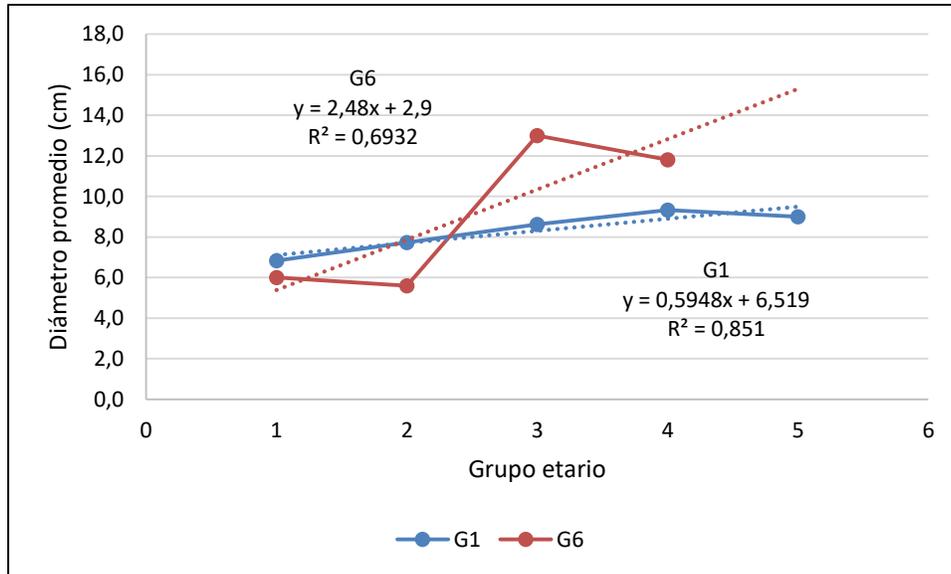


Figura 36. Variación de las medidas promedio del diámetro mayor de quistes hepáticos G1 y G6 en función del grupo etario del paciente. (R^2 : coeficiente de regresión lineal; Grupo etario 1 (pacientes pediátricos): 1-18 años; 2: 19-37 años; 3: 38-56; 4: 57-75; 76-81 años). No se observaron casos de pacientes entre 76 y 81 años para el genotipo G6. La línea punteada indica la línea de tendencia.

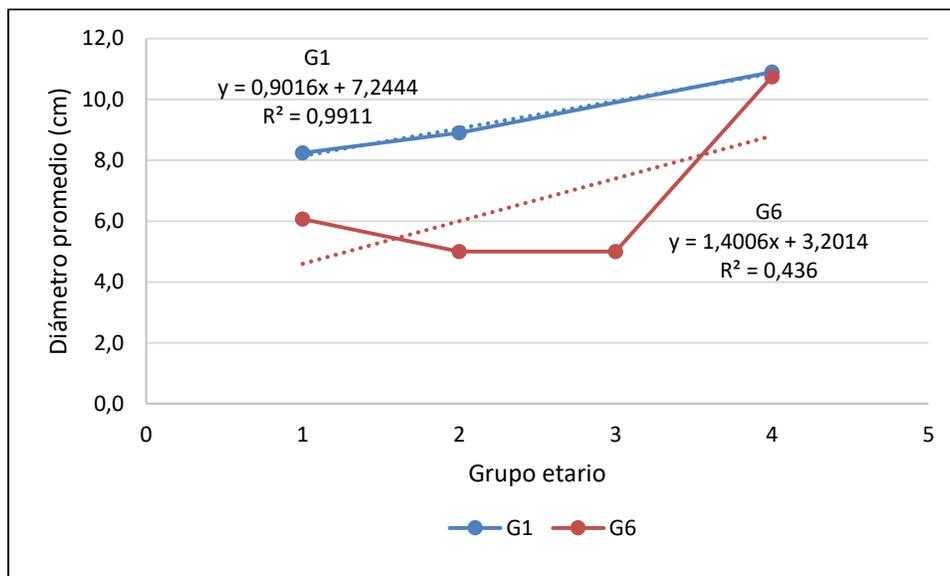


Figura 37. Variación de las medidas promedio del diámetro mayor de quistes pulmonares G1 y G6 en función del grupo etario del paciente. (R^2 : coeficiente de regresión lineal; Grupo etario 1 (pacientes pediátricos): 1-18 años; 2: 19-37 años; 3: 38-56; 4: 57-75 años). No se observaron casos de pacientes entre 57 y 75 años. La línea punteada indica la línea de tendencia.

4.2.9. Determinación del estadio de los quistes hepáticos utilizando el criterio de OMS

Se obtuvo la clasificación de OMS para los estudios ecográficos de 36 pacientes que albergaban en total 54 QH hepáticos, de los cuales 23 fueron quistes activos (CE1 y CE2), 19 quistes transicionales (CE3) y 12 quistes inactivos (CE4) (Tabla 24). No se incluyeron en el estudio pacientes con quistes CE5.

Tabla 24. Clasificación por OMS de quistes hidatídicos hepáticos de pacientes de Neuquén (n=54)

Estadio (OMS)	N° de quistes	% del total
CE1	14	25,9
CE2	9	16,7
CE3	19	35,2
CE4	12	22,2
Total	54	100,0

4.2.9.1. Relación entre genotipo y estadio de los quistes hepáticos según OMS

En aquellos pacientes que se pudo determinar el genotipo del QH y se obtuvo información sobre el estadio del QH hepático siguiendo el criterio de OMS (n= 48), se evaluó la relación entre el genotipo del QH y el estadio del QH (Tabla 25). El genotipo G1 presentó los 4 estadios encontrados, mientras que G3 presentó los estadios CE2, CE3 y CE4, y G6 presentó los estadios CE1, CE3 y CE4. El 85,7% (30/35) de los QH G1 eran activos y transicionales, mientras que el 55,6% (5/9) de los QH G6 eran inactivos, observándose diferencias significativas ($\chi^2= 6,94$; $p= 0,0084$).

Tabla 25. Distribución de los genotipos de los QH hepáticos según el estadio del quiste (OMS) (n=48)

	G1	G3	G6
	n (%) ^a	n (%) ^a	n (%) ^a
CE1	10 (28,6)	0 (0,0)	1 (11,1)
CE2	8 (22,8)	1 (25,0)	0 (0,0)
CE3	12 (34,3)	2 (50,0)	3 (33,3)
CE4	5 (14,3)	1 (25,0)	5 (55,6)
Total	35 (100,0)	4 (100,0)	9 (100,0)

a: número y porcentaje de quistes hepáticos de acuerdo al genotipo y el estadio del quistes según OMS

La edad de los pacientes y el diámetro mayor de los QH hepáticos en función del estadio del QH de acuerdo a la clasificación de OMS se muestra en la tabla 26. En este estudio se asumió que la infección ocurre a los 3 años en un área endémica, para poder determinar el número promedio de años que los quistes permanecen en cada estadio. Conociendo la edad promedio de cada estadio, se estimó que el estadio CE1 se desarrolló en un promedio de 15 años, CE2 en 3 años, CE3 en 18 años y CE4 en 6 años.

Tablas 26. Edad de pacientes y diámetro de quistes de acuerdo al estadio del quiste hidatídico

	Tipo de QH			
	CE1	CE2	CE3	CE4
Edad (años)				
Rango	4-38	4-48	5-70	26-60
Promedio	17,9	21,1	35,9	45,2
Tiempo de infección promedio en cada estadio (años)	15	3	18	6
Diámetro (cm)				
Rango	4,0-12,0	1,8-10,0	1,8-19,5	1,9-20
Promedio	6,3±1,6	6,3±2,8	9,1±4,9	6,8±5,1

4.2.10. Sintomatología de los pacientes

Fue posible obtener la información acerca de la sintomatología de 83 pacientes. El 84,3% (70/83) de los pacientes presentaban síntomas y el 15,7% (13/83) fue pesquisado por exámenes de rutina. El 100,0% (17/17) de los pacientes con QH menores o iguales a 5 cm de diámetro y el 79,0% (49/62) de los pacientes con QH mayores a 5 cm presentaron síntomas. En aquellos pacientes con más de un quiste, se tomó en cuenta la medida del quiste más grande. El 78,6% (22/28) de los pacientes menores de 18 años presentaron síntomas, de los cuáles sólo 3 pacientes presentaron QH menores a 5,0 cm. Los niños asintomáticos (6/28) presentaron QH mayores a 5,0 cm. El 80,0% de los pacientes que tenían quistes en el abdomen (hígado, peritoneo y retroperitoneo) presentaron síntomas. El dolor abdominal fue el síntoma más frecuente de los reportados (Tabla 27). El 89,7% de los pacientes con quistes en la cavidad torácica presentaron síntomas, los más frecuentes fueron tos (62,9%) y dolor torácico (48,6%). Además, algunos pacientes presentaron síntomas abdominales (vómitos y dolor abdominal) a pesar de presentar quistes pulmonares. El 100% de los pacientes con quistes vertebrales presentaron síntomas neurológicos, déficit neurológico focal agudo y canal estrecho medular. La fiebre fue el síntoma sistémico más frecuente con 14 casos.

No se observaron diferencias significativas entre el número de quistes y la presencia/ausencia de síntomas ($\chi^2= 3,53$; $p= 0,6183$).

Tablas 27. Características clínicas de los pacientes sintomáticos (n=70)

Síntomas	n/N ^a	%
Síntomas abdominales en pacientes con quistes abdominales	32/40	80,0
Dolor abdominal	29/32	90,6
Vómitos	12/32	37,5
Apertura a vía biliar	6/32	18,7
Nauseas	3/32	9,4
Síntomas no abdominales en pacientes con quistes abdominales	2/40	5,0
Tos	1/32	3,1
Dolor torácico	1/32	3,1
Síntomas respiratorios en pacientes con quistes torácicos	35/39	89,7
Tos	22/35	62,9
Dolor torácico	17/35	48,6
Hemoptisis	11/35	31,4
Vómica	7/35	20,0
Neumotórax/Hemoneumotórax	2/35	5,7
Neumonía	1/35	2,8
Insuficiencia respiratoria	1/35	2,8
Síntomas no respiratorios en pacientes con quistes torácicos	9/35	25,7
Vómitos	5/35	14,3
Dolor abdominal	2/35	5,7
Síntomas neurológicos en pacientes con quistes vertebrales	2/2	100,0
Déficit neurológico focal agudo	1/2	50,0
Canal estrecho medular	1/2	50,0
Síntomas sistémicos	17/70	24,3
Fiebre	14/70	20,0
Supuración	2/70	2,8
Anafilaxia	1/70	1,4
Anorexia	4/70	5,7

a= n: pacientes con síntoma; N: pacientes con datos disponibles

4.2.10.1. Relación entre genotipo y sintomatología del paciente

El 78,0% (32/41) de los pacientes infectados con el genotipo G1 y el 85,2% (23/27) de los pacientes infectados con el genotipo G6 presentaban sintomatología. No se observó una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo y la sintomatología del paciente ($\chi^2= 0,54$; $p= 0,464$). Se analizó la relación entre el genotipo del QH y los síntomas más frecuentes descritos en los pacientes con QH abdominales y torácicos. En los pacientes que presentaban QH abdominales y presentaban como sintomatología dolor abdominal se observó que el 66,7% (16/24) de los pacientes estaban infectados con el genotipo G1, mientras que el 33,3% (8/24) de los pacientes estaban infectados con el genotipo G6 ($\chi^2= 0,60$; $p= 0,436$). En los pacientes que presentaban QH torácicos y presentaban como sintomatología tos se observó que el 42,1% (8/19) de los pacientes estaban infectados con el genotipo G1, mientras que el 57,9% (11/19) de los pacientes estaban infectados con el genotipo G6 ($\chi^2= 0,03$; $p= 0,858$). El único paciente con 4 quistes hepáticos G3 presentó síntomas no abdominales (tos y dolor torácico).

ESTUDIO 3: Aspectos inmunológicos de la infección por *Echinococcus granulosus* sensu lato en humanos

4.3.1. Comparación de la sensibilidad de diferentes métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgG anti *Echinococcus granulosus* sensu lato en humanos

En este estudio se comparó la sensibilidad de tres métodos comerciales para la detección de anticuerpos anti *E. granulosus* sensu lato utilizando suero de 63 pacientes con EQ confirmada. Se evaluaron los siguientes test: ELISA IgG, test inmunocromatográfico rápido (TIR) y hemoaglutinación indirecta (HAI). La sensibilidad para el total de sueros analizados por ELISA IgG fue de 82,5% (52/63), por TIR fue de 87,3% (55/63) y por HAI fue 74,6% (47/63). Se encontraron diferencias significativas entre los tests serológicos TIR y HAI ($\chi^2=18,65$; $p=0,0001$) y ELISA IgG y HAI ($\chi^2=15,75$; $p<0,0001$). No se encontraron diferencias significativas entre ELISA IgG y TIR ($\chi^2=2,90$; $p=0,088$).

Los métodos que presentaron mejor sensibilidad fueron ELISA IgG y TIR, sin diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, para la evaluación de la respuesta inmune en relación a distintas variables, como genotipo, localización, estadio según OMS, tamaño del QH, número de QH por pacientes y el grupo etario, se analizaron los resultados de los tests de ELISA IgG y/o TIR realizados a los sueros de los pacientes. Un suero se consideró como positivo cuando el resultado dio positivo con ELISA IgG y/o TIR.

4.3.1.1. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al genotipo del QH

En aquellos pacientes que se pudo determinar el genotipo del QH se evaluó la relación entre el genotipo del QH y la serología del paciente. La tabla 28 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al genotipo de los quistes que albergaba el paciente. No se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de positividad de los pacientes infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G6 ($\chi^2=0,13$; $p=0,7204$).

Tabla 28. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al genotipo de los quistes hidatídicos presentes en los pacientes (n=85)

	n/N ^a	% de positividad
G1	40/46	87,0
G3	1/1	100,0
G6	32/38	84,2

a: n= número de pacientes con serología positiva para cada genotipo; N= número total de pacientes para cada genotipo

4.3.1.2. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación a la localización anatómica del QH

La tabla 29 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo a la localización de el/los quiste/s presentes en el paciente. No se observan diferencias significativas entre el porcentaje de positividad de los pacientes con QH hepáticos y los pacientes con QH pulmonares ($\chi^2=0,24$; $p=0,6255$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de positividad de los pacientes con QH hepáticos y pacientes con QH extrahepáticos ($\chi^2=0,80$; $p=0,669$).

Tabla 29. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo a la localización de el/los quiste/s presentes en los pacientes (n=96)

	n/N ^a	% de positividad
Hepática	35/43	81,4
Pulmonar	35/41	85,4
Hepática y peritoneal	4/4	100,0
Ósea (vertebral)	3/3	100,0
Ósea (fémur)	1/1	100,0
Extrapleural	1/1	100,0
Retroperitoneal	1/1	100,0
Renal	1/2	50,0

a: n= número de pacientes con serología positiva para cada localización; N= número total de pacientes analizados

4.3.1.3. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al estadio según OMS de QH hepáticos

En aquellos pacientes que se obtuvo información sobre el estadio del QH hepático se evaluó la relación entre el estadio según OMS del QH y la serología del paciente. La tabla 30 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al estadio de los quistes hepáticos según OMS. El 100,0% de los QH activos/transicionales según OMS presentaron serología positiva, observándose diferencias significativas con los QH inactivos ($\chi^2=10,25$; $p=0,0014$).

Tabla 30. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al estadio de los quistes hepáticos según OMS (n=35)

	Estadio del quiste (OMS)	n/N ^a	% de positividad
Quistes activos/ transicionales	CE1	12/12	100,0
	CE2	6/6	100,0
	CE3	11/11	100,0
Quistes inactivos	CE4	4/6	66,7

a; n= número de pacientes con serología positiva para cada estadio de quistes hepáticos según OMS; N= número total de pacientes analizados

b: IC 95%= intervalo de confianza del 95%

4.3.1.4. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al tamaño del QH

En los pacientes que se pudo determinar el tamaño del QH se evaluó la relación entre el tamaño del QH y la serología del paciente. La tabla 31 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño del quiste. Se encontraron diferencias significativas entre los QH de tamaño mediano ($5 \text{ cm} < X \leq 10 \text{ cm}$) y tamaño grande ($X > 10 \text{ cm}$) ($\chi^2= 5,6$; $p= 0,017$). No se encontraron diferencias significativas entre los QH de tamaño pequeño y mediano ($\chi^2= 0,07$; $p= 0,8$) ni en tamaño pequeño y grande ($\chi^2= 2,53$; $p= 0,11$).

Tabla 31. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño del QH (n=85)

Diámetro mayor del quiste	n/N ^a	% de positividad
X ≤ 5 cm	17/19	89,5
5 cm < X ≤ 10 cm	43/47	91,5
X > 10 cm	13/19	68,4

a: n= número de pacientes con serología positiva para cada rango de tamaño; N= número total de pacientes analizados

En el grupo de pacientes con QH hepáticos que se pudo determinar el tamaño del QH se evaluó la relación entre el tamaño del QH y la serología del paciente. La tabla 32 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño del quiste hepático. Se encontraron diferencias significativas entre los QH de tamaño pequeño ($X \leq 5$ cm) y tamaño mediano ($5 \text{ cm} < X \leq 10$ cm) ($\chi^2= 6,85$; $p= 0,008$). No se encontraron diferencias significativas entre los QH de tamaño pequeño y grande ($\chi^2= 0,68$; $p= 0,4$) ni en los QH de tamaño mediano y grande ($\chi^2= 3,56$; $p= 0,06$).

Tabla 32. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño de los QH hepáticos (n=36)

Diámetro mayor del quiste hepático	n/N ^a	% de positividad
X ≤ 5 cm	2/4	50,0
5 cm < X ≤ 10 cm	21/22	95,5
X > 10 cm	8/10	80,0

a: n= número de pacientes con serología positiva para cada rango de tamaño; N= número total de pacientes analizados

En el grupo de pacientes con QH pulmonar que se pudo determinar el tamaño del QH se evaluó la relación entre el tamaño del QH y la serología del paciente. La tabla 33 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño del quiste pulmonar. El porcentaje de positividad de la serología fue del 100,0% para todos los tamaños.

Tabla 33. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al tamaño de los QH pulmonares (n=32).

Diámetro mayor del quiste pulmonar	n/N ^a	% de positividad
X ≤ 5 cm	11/11	100,0
5 cm < X ≤ 10 cm	17/17	100,0
X > 10 cm	4/4	100,0

a: n= número de pacientes con serología positiva para cada rango de tamaño; N= número total de pacientes analizados

4.3.1.5. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al número de QH

La tabla 34 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al número de quistes por paciente. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de positividad de los pacientes que presentaban 1, 2 o más de 3 QH ($\chi^2=3,56$; $p=0,168$).

Tabla 34. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al número de quistes hidatídicos por paciente (n=96)

N° de quistes por paciente	n/N ^a	% de positividad
1	57/71	80,3
2	18/19	94,7
3	2/2	100,0
4	2/2	100,0
5	1/1	100,0
6	1/1	100,0

a; n= número de pacientes con serología positiva de acuerdo al número de QH por paciente; N= número total de pacientes analizados

4.3.1.6. Evaluación de la respuesta inmune del paciente en relación al grupo etario

La tabla 35 muestra el porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al grupo etario de los pacientes. No se observaron diferencias significativas entre pacientes pediátricos (< de 18 años) y pacientes adultos (> de 18 años) ($\chi^2=0,63$; $p=0,4261$).

Tabla 35. Porcentaje de positividad de la serología (ELISA IgG y/o TIR) de acuerdo al grupo etario de los pacientes (n=93)

Grupo etario	n/N ^a	% de positividad
< 18 años	24/30	80,0
> 18 años	55/63	87,3

a: n= número de pacientes con serología positiva de acuerdo al número de QH por paciente; N= número total de pacientes analizados

4.3.2. Perfil proteico del líquido hidatídico de quistes de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos y humanos

El perfil proteico de los LH obtenidos de diferentes HI y humanos de Neuquén resuelto en corridas de SDS-PAGE y coloración con Azul de Coomassie se presenta en la tabla 36.

Los LH de origen caprino analizados correspondían al genotipo G6, eran de localización pulmonar y fértiles. Se observaron 19 bandas y las principales fracciones proteicas correspondieron a bandas de 11, 13, 27, 39, 58, 64, 100 y 130 KDa (Figura 38).

Los LH de origen porcino analizados correspondían al genotipo G7, eran de localización hepática y fértiles. La separación de proteínas mostró 21 bandas, siendo las de mayor intensidad las correspondientes a 8, 11, 24, 53, 63, 84, 96, 106, 151 y 198 KDa.

Tabla 36. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil proteico realizado en SDS-PAGE del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios y genotipos

LH caprino G6 Pulmón Fértil	LH porcino G7 Hígado Fértil	LH ovino G1 Hígado Fértil	LH bovino G1 Pulmón Infértil	LH humano G1 Hígado Fértil	LH humano G1 Pulmón Fértil	LH humano G6 Hígado Fértil	LH humano G6 Pulmón Fértil
--	312	--	--	289-312	--	--	--
--	--	--	--	241	262	--	--
220	--	--	--	215	--	--	--
200	198	199	200	198	204	--	--
181	177	187	178	181	178	179	177
155	151	--	153	150	159	152	151
130	134	133	--	134	138	--	138
--	119	--	123	124	123	127	125
--	--	--	114	--	112	117	--
100	106	103	--	106	--	105	--
--	96	--	90	92	95	90	98
85	84	86	--	85	86	--	84
77	76	81	77	77	76	77	--
64	63	65	63	64	64	66	65
58	--	--	--	--	58-62	--	--
--	53	--	--	55	53	52	--
50	--	--	--	47	49	--	--
45	44	--	--	44	44	42	45
39	34	36	39	35	37	34	34
--	31	--	--	--	32	--	--
27	27	--	26	27	27	26	26
23	24	--	--	21	24	25	--
--	20	--	--	--	18	--	19
16	16	--	--	15	--	17	16
13	--	14	--	--	--	--	14
11	11	--	--	10	10	10	--
8	8	8	--	8	8	8	8

Pesos moleculares expresados en KDa.

Nota: las bandas más intensas se resaltaron en negrita.

Los LH de origen ovino genotipo G1, de localización hepática y fértiles, presentaron solamente 10 bandas, siendo la de mayor intensidad la correspondiente a 65 KDa.

Los LH de origen bovino analizados pertenecían al genotipo G1, eran de localización pulmonar e infértiles. Se observaron únicamente 10 bandas y la principal banda correspondía a 63 KDa.

Los LH provenientes de QH humanos genotipo G1, de localización hepática y pulmonar fértiles, mostraron 22 bandas. Las principales bandas para los LH de localización hepática fueron 8, 10, 55, 64, 85, 92, 106, 124, 134 y 150 KDa, mientras que para los LH de localización pulmonar fueron 8, 53, 64, 112 y 138 KDa. Los LH provenientes de QH humanos de genotipo G6 mostraron menos bandas que los de genotipo G1. Los LH G6 de localización hepática fértiles presentaron 14 bandas, siendo las de mayor intensidad las correspondientes a 10, 52, 66 y 125 KDa; mientras que los LH G6 obtenidos de QH de localización pulmonar fértiles presentaron 15 bandas y las principales correspondientes a 8, 65, 98 y 151 KDa.

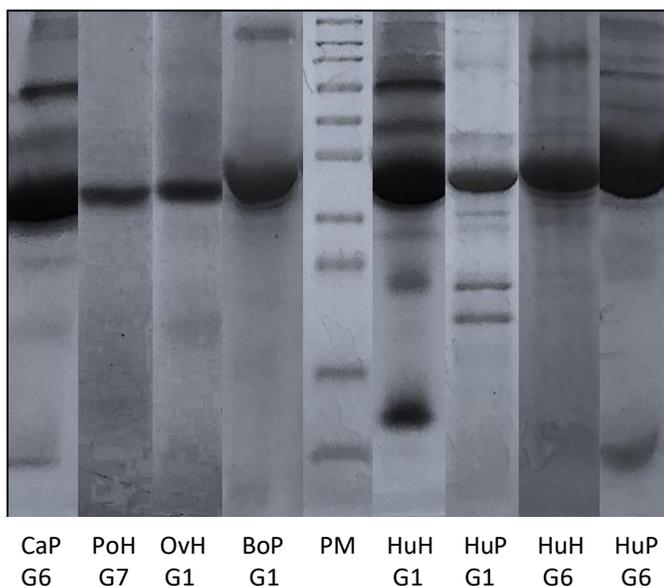


Figura 38. Separación de las fracciones proteicas de líquidos hidatídicos concentrados en SDS-PAGE 12 %. PM: marcador de peso molecular. Bo: bovino; Ca: caprino; Ov: ovino; Po: porcino; Hu: humano. P: pulmonar; H: hepático.

4.3.3. Caracterización antigénica del líquido hidatídico de quistes de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos y humanos

El perfil antigénico del LH obtenido de diferentes HI (caprinos, ovinos, porcinos, bovinos y humanos) de Neuquén se realizó por IB utilizando sueros de humanos con

hidatidosis confirmada y con sueros controles (Figura 39). Para los sueros con hidatidosis se seleccionaron sueros de pacientes que presentaban título elevado de anticuerpos anti *E. granulosus* sensu lato, mientras que para los sueros controles se utilizaron sueros de humanos sanos (ítem 3.3.1.). Los sueros seleccionados pertenecían a pacientes infectados con genotipo G1, G3, G6 o G1/G7.

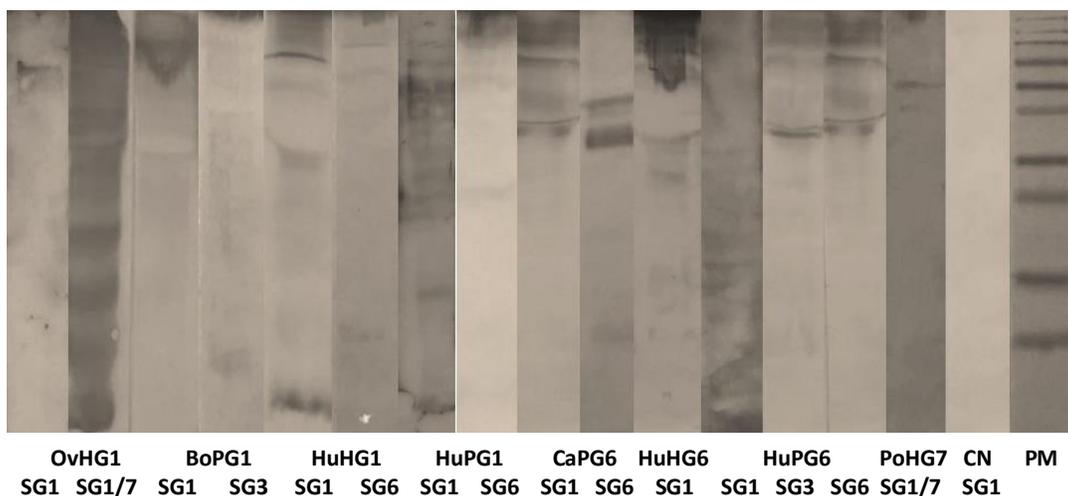


Figura 39. Caracterización por inmunoblot de antígenos de líquidos hidatídicos de origen caprino, ovino, bovino, porcino y humano con sueros de humanos infectados con distintos genotipos de *Echinococcus granulosus* sensu lato. CN: control negativo. PM: marcador de peso molecular. Bo: bovino; Ca: caprino; Ov: ovino; Po: porcino; Hu: humano. P: pulmonar; H: hepático. SG1, SG3, SG6, SG1/7: suero G1, G3, G6, G1/7 con el que se enfrentaron los LH.

El perfil antigénico obtenido al enfrentar el suero G1 con los LH provenientes de los distintos hospedadores con distintas localizaciones y genotipos se muestra en la tabla 37. Los sueros de humano control no mostraron ninguna banda al ser enfrentado con los LH provenientes de los distintos hospedadores. Los LH obtenidos de QH humanos genotipo G1 presentaron la mayor cantidad de bandas, observándose 15 bandas en la localización hepática y 14 en la localización pulmonar. El LH de origen ovino G1 presentó 12 bandas, mientras que el LH de origen humano hepático G6 presentó 11 bandas. Los LH de origen bovino, caprino, humano pulmonar G6 y porcino presentaron menor cantidad de bandas, entre 3 y 8 bandas. La banda de 8 KDa se observó en todos los LH excepto en los LH obtenidos de bovinos G1 y humanos pulmonares G6, y presentó mayor intensidad en

ovinos, humanos G1 (hepática y pulmonar), caprinos y porcinos. La banda de 45-47 KDa se observó en todos los LH excepto en el LH de origen porcino G7.

Tabla 37. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente a suero de humanos infectados con *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1

Hospedador	Ovino	Bovino	Humano	Humano	Caprino	Humano	Humano	Porcino
Localización	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado
Fertilidad	Fértil	Infértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil
Genotipo	G1				G6			G7
	--	--	--	245	--	--	--	--
	--	--	--	209	--	213	--	--
	200	--	205	--	--	205	--	--
	--	191	188	182	--	--	181	--
	--	--	174	--	--	--	--	178
	--	152	153	--	--	--	157	--
	--	--	141	146	--	--	136	--
	127	--	130	131	--	125	--	--
	116	--	120	116	--	--	120	--
	106	101	106	103	--	102-110	110	--
	--	--	90	88	--	--	94	--
	80	--	83	--	--	83	--	--
	64	--	--	71	--	--	--	--
	53	--	--	57	51	--	51	--
	45	46	47	47	45	45	45	--
	--	39	--	--	--	38	--	--
	29	--	32	25	26	32	--	33
	19	--	20	--	19	--	--	--
	12	--	14	12-14	12-16	12	--	--
	8	--	8	8	8	8	--	8

Pesos moleculares expresados en KDa.

Nota: las bandas más intensas se resaltaron en negrita.

El perfil antigénico obtenido frente a suero G3 con los LH provenientes de los distintos hospedadores con distintas localizaciones y genotipos se muestra en la tabla 38. El LH con mayor cantidad de bandas fue el LH de origen humano pulmonar G6, que presentó 10 bandas. La banda de 8 KDa se observó en todos los LH excepto en los LH obtenidos de QH humanos pulmonares G1, y presentó mayor intensidad en ovinos, humanos G1 (hepática), caprinos, humano (hepática) G6 y porcinos.

Tabla 38. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente a suero de humanos infectados con *Echinococcus granulosus sensu stricto* G3

Hospedador	Ovino	Bovino	Humano	Humano	Caprino	Humano	Humano	Porcino
Localización	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado
Fertilidad	Fértil	Infértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil
Genotipo	G1				G6			G7
	--	--	--		--	205	--	--
	--	--	--	--	--	188	181	--
	--	--	--	--	--	160	160	--
	--	152	145	--	--	136	141	138
	126	--	--	--	--	--	130	126
	--	--	101	--	--	--	115	--
	90	106	--	--	--	--	94	--
	64	61	--	--	--	--	--	64
	--	--	51	55	58	--	--	--
	--	--	--	49	49	41-47	47	--
	32	--	34	--	32	--	--	--
	--	--	28	--	--	25	28	--
	18	--	20-22	--	23	--	21	--
	10	--	--	--	10-14	11	--	--
	8	8	8	--	8	8	8	8

Pesos moleculares expresados en KDa.

Nota: las bandas más intensas se resaltaron en negrita.

El perfil de IB obtenido al enfrentar el suero G6 con los LH provenientes de los distintos hospedadores con distintas localizaciones y genotipos se muestra en la tabla 39. Se observó menor cantidad de bandas con respecto a los sueros G1 y G3. Los LH obtenidos de QH caprinos y humanos pulmonares G6 fueron los que presentaron mayor cantidad de bandas, con un total de 8 bandas.

Tabla 39. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente a suero de humanos infectados con *Echinococcus canadensis* G6

Hospedador	Ovino	Bovino	Humano	Humano	Caprino	Humano	Humano	Porcino
Localización	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Pulmón	Hígado	Pulmón	Hígado
Fertilidad	Fértil	Infértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil
Genotipo	G1				G6			G7
	--	--	--	205	200	200	--	--
	178	--	--	--	183	183	--	178
	--	--	--	163	--	--	163	--
	--	145	152	--	145	--	141	--
	116	--	116	120	--	116	130	116
	--	111	--	110	--	--	110	--
	--	--	101	--	--	--	94	--
	72	--	77	80	80	--	--	--
	58	--	56	--	56	--	62	--
	--	--	--	--	51	--	51	--
	--	--	--	--	41	42	47	--
	32	--	--	27	--	--	--	31
	--	--	--	--	--	--	--	16
	8	--	8	--	8	--	--	8

Pesos moleculares expresados en KDa.

Nota: las bandas más intensas se resaltaron en negrita.

El perfil antigénico obtenido al enfrentar el suero del paciente que estaba coinfectado con el genotipo G1 y G7 con los LH provenientes de los distintos hospedadores con distintas localizaciones y genotipos se muestra en la tabla 40. La mayor cantidad de bandas se observó en el LH de origen ovino y bovino, con un total de 5 bandas. Ninguno de los LH presentó la banda de 8 KDa.

Tabla 40. Pesos moleculares de las bandas observadas en el perfil antigénico realizado por inmunoblot del líquido hidatídico proveniente de diferentes hospedadores intermediarios, localización y genotipos frente al suero de un humano coinfectado con *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1 y *Echinococcus canadensis* G7

Hospedador	Ovino	Bovino	Humano	Humano	Caprino	Porcino
Localización	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón	Pulmón	Hígado
Fertilidad	Fértil	Infértil	Fértil	Fértil	Fértil	Fértil
Genotipo	G1				G6	G7
	--	205	--	209	--	--
	186	188	183	--	--	196
	163	167	--	--	175	--
	150	153	--	--	--	153
	126	--	127	--	--	--
	132	--	--	--	--	--
	--	110	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	67
	--	--	--	57-58	--	57
	14	--	--	--	14	--

Pesos moleculares expresados en KDa.

Nota: las bandas más intensas se resaltaron en negrita.

4.3.4. Evaluación de la respuesta inmune de pacientes infectados con quistes de diferentes genotipos mediante inmunoblot frente a diferentes perfiles antigénicos de líquido hidatídico

En aquellos pacientes infectados con el genotipo G1 y G6 se evaluó la respuesta inmune mediante IB enfrentando el suero de los pacientes a diferentes perfiles antigénicos de LH (Tabla 37 y 39). El suero de pacientes infectados con el genotipo G1 tuvo una mejor respuesta inmune cuando se los enfrentó a los distintos LH que aquellos pacientes infectados con el genotipo G6, ya que reconocieron mayor cantidad de bandas antigénicas. Sin embargo, ambos tipos de sueros fueron positivos para los distintos LH. Los pacientes infectados con el genotipo G6 tuvieron una mejor respuesta al ser enfrentados con los LH de origen caprino G6.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis fue abordar la problemática de la EQ en la provincia de Neuquén teniendo en cuenta que, a pesar de contar con un programa de control desde 1970, continúa siendo una zoonosis endémica con importantes consecuencias para la salud humana. El trabajo aporta nuevos conocimientos sobre la variabilidad genética y fenotípica de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato que podrían contribuir al mejoramiento de la situación epidemiológica, especialmente en las poblaciones más vulnerables. La tesis se dividió en tres estudios para organizar el trabajo experimental.

5.1. ESTUDIO 1: Caracterización molecular y biológica de quistes hidatídicos de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de la provincia de Neuquén.

En el presente trabajo se evaluaron los aspectos moleculares y biológicos de los QH obtenidos de los HI domésticos más numerosos de la provincia de Neuquén (caprinos, ovinos, bovinos y porcinos), con el objetivo de analizar su participación en el/los ciclos biológicos de *E. granulosus* sensu lato.

Los HI estudiados pertenecían a localidades del norte y centro de la provincia de Neuquén. Estas localidades están ubicadas en las zonas de más alta endemicidad de hidatidosis humana, con IAP por 100.000 habitantes entre 1995-2004 de 78,4 y 66,6 para zona norte y central, respectivamente, en la población general (Pierangeli *et al.*, 2007). Se detectaron QH en las cuatro especies de HI estudiados, lo que demostró que los caprinos, ovinos, porcinos y bovinos fueron susceptibles a la infección por *E. granulosus* sensu lato. La presencia de diferentes HI con QH en una misma zona geográfica sugiere que existen ciclos simultáneos de transmisión de *E. granulosus* sensu lato en la región estudiada. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente en la provincia de Neuquén por Soriano *et al.* (2010), Soriano (2011) y Pierangeli (2013).

La epidemiología molecular de la EQ en ganado de Argentina es compleja, ya que se ha descrito una gran diversidad de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato. Los reportes correspondientes a aislamientos en distintos HI de diferentes provincias del país,

indican la presencia de *E. granulosus* sensu stricto G1-G3 en ovinos, bovinos, caprinos y porcinos, *E. ortleppi* G5 en bovinos, *E. canadensis* G6 en caprinos y G7 en porcinos (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010; Andresiuk *et al.*, 2013; Cucher *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017).

La genotipificación de los aislamientos provenientes de los principales HI domésticos (caprinos, ovinos, porcinos y bovinos) de Neuquén demostró que en la provincia se encuentran presentes las siguientes especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato: *E. granulosus* sensu stricto G1 (genotipo originalmente descrito por Bowles *et al.* (1992) y dos haplotipos descritos previamente por Soriano *et al.* (2010)) y *E. canadensis* genotipos G6 y G7 (genotipo original de G7, más un haplotipo nuevo). Estos resultados confirman la presencia de los genotipos G1, G6 y G7 reportados anteriormente en Neuquén (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010, 2015) e incorporan a su vez, un haplotipo que no había sido detectado previamente en la región: G7nqn01. Neuquén es una de las provincias argentinas con mayor diversidad genotípica y hasta el momento se habían descrito cuatro genotipos: *E. granulosus* sensu stricto G1 en caprinos y ovinos, *E. granulosus* sensu stricto G3 en ovinos, *E. canadensis* G6 en caprinos y bovinos y *E. canadensis* G7 en porcinos (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010, 2015). Las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato encontradas en los distintos HI en la provincia de Neuquén han demostrado ser infectivas para el humano y en consecuencia implican riesgo de transmisión a la población (Romig *et al.*, 2017).

Estudios de epidemiología molecular a partir de HI de diversas partes del mundo indican que *E. canadensis* G6 es la segunda causa de infección, luego del genotipo *E. granulosus* sensu stricto G1 en aquellas regiones donde hay HI infectados con ambos genotipos (Deplazes *et al.*, 2017). Los resultados del presente trabajo indicaron que no existen diferencias significativas en el número de QH genotipo G1 (con los dos haplotipos encontrados) y genotipo G6 (Tabla 2). Esto podría explicarse por el hecho de que en la provincia de Neuquén predomina la crianza de ganado caprino, hospedador que actúa como un reservorio del genotipo G6 (Soriano *et al.*, 2010). Esto demuestra entonces que

tanto el genotipo G1 como el G6 tienen importancia similar en la epidemiología de la echinococcosis en la provincia de Neuquén.

Los genotipos *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G7 presentaron microvariantes en la secuencia parcial del gen mitocondrial que codifica para *cox1*, con respecto a la descrita originalmente por Bowles *et al.* (1992). Esta variabilidad se observa en sustituciones puntuales de bases en distintas posiciones de la fracción de 366 pb del gen *cox1*, cuando se compara con la secuencia de referencia (Vural *et al.*, 2008). En el presente trabajo se encontraron tres haplotipos correspondientes a *E. granulosus* sensu stricto G1, descritos previamente en la provincia de Neuquén por Soriano *et al.* (2010) y Soriano (2011). Se encontró el haplotipo G1, descrito originalmente por Bowles *et al.* (1992), y los haplotipos G1nqnB y G1nqnD que difieren del genotipo de referencia en una base en cada caso, en diferentes posiciones de la secuencia. El haplotipo G1nqnD presentó una sustitución no sinónima. Se detectó, por primera vez en el mundo, el haplotipo G7nqn01 que difiere de la secuencia de referencia en tres bases. Estas sustituciones no se deben a errores de incorporación de la *Taq* polimerasa debido a que las mismas ocurren en las mismas posiciones en extractos de ADN de diferentes muestras y en repetidas reacciones de PCR.

Echinococcus granulosus sensu stricto G1 se identificó en los cuatro tipos de HI estudiados en el presente trabajo, dando origen a todos los QH de ovinos y a aproximadamente al 90,0% de los QH de bovinos. El genotipo G1 presentó una asociación estadísticamente significativa tanto con ovinos como con bovinos. Los datos epidemiológicos sugieren que esta especie está particularmente bien adaptada a los ovinos como HI, lo que se refleja en una alta prevalencia y, en menor medida, afecta a los caprinos y porcinos (Deplazes *et al.*, 2017). El haplotipo G1nqnB fue encontrado en dos ovejas y una cabra, mientras que el haplotipo G1nqnD fue detectado en una oveja. En el presente trabajo se describe por primera vez en la provincia de Neuquén la infección de un cerdo con *E. granulosus* sensu stricto G1, genotipo originalmente descrito por Bowles *et al.* (1992). El cerdo es el HI natural del genotipo G7, sin embargo se han reportado porcinos infectados

por otros genotipos: G1 en Argentina, Brasil, Perú, España, Italia, Bulgaria, Serbia y Egipto (González *et al.*, 2002; Breyer *et al.*, 2004; Daniel-Mwambete *et al.*, 2004; Varcasia *et al.*, 2006; Bobic *et al.*, 2012; Cucher *et al.*, 2016); G3 y G5 en India (Singh *et al.*, 2014); así como G6 en Egipto (Abdel Aaty *et al.*, 2012). En las provincias de Buenos Aires y Río Negro se han descrito algunas infecciones de cerdos con el genotipo G1 (Kamenetzky *et al.*, 2002).

Los caprinos y bovinos fueron los HI domésticos susceptibles a la infección por *E. canadensis* G6 identificados en Neuquén. Del total de QH caracterizados genéticamente como pertenecientes a este genotipo, la mayoría correspondió a QH de origen caprino, mientras que un solo aislamiento fue de origen bovino (Tabla 2). En otros lugares del mundo se ha reportado la infección de ganado caprino con los genotipos G1, G3, G5, G6 y G7 (Deplazes *et al.*, 2017). Dichos genotipos, con excepción de G5, están presentes en la provincia de Neuquén. Soriano *et al.* (2010) determinaron que en Neuquén el ganado caprino es altamente susceptible a la infección con *E. canadensis* G6. Los resultados del presente trabajo corroboran dicho hallazgo ya que casi la totalidad de los aislamientos provenientes de caprinos correspondieron a *E. canadensis* G6. Además, se observó asociación estadísticamente significativa entre caprinos y el genotipo G6.

Todas las secuencias parciales del gen mitocondrial *cox1* correspondientes a *E. canadensis* G6 fueron idénticas entre sí y presentaron 100,0% de homología con las secuencias publicadas en la base internacional de datos genéticos GenBank. Estos hallazgos coinciden con otros reportes en donde no se detectaron otros haplotipos de *E. canadensis* G6 en la secuencia parcial del gen *cox1* (Kamenetzky *et al.*, 2002; Maillard *et al.*, 2007; Casulli *et al.*, 2010; Soriano *et al.*, 2010).

Echinococcus canadensis G7 se asocia principalmente con infección en cerdos (HI doméstico) y en jabalíes (HI silvestre) aunque también se ha demostrado su infectividad para bovinos, caprinos, ovinos y cérvidos (Scott *et al.*, 1997; Turceková *et al.*, 2003; Dinkel *et al.*, 2004; Daniel-Mwambete *et al.*, 2004; Varcasia *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2007; Bruzinskaite *et al.*, 2009; Snàbel *et al.*, 2009; Bobic *et al.*, 2012; Onac *et al.*, 2013; Marcinkute *et al.*, 2015). La presencia de este genotipo había sido reportada en la provincia de Neuquén

a partir de un único aislamiento proveniente de un perro y numerosos aislamientos de cerdos (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010). En el ganado estudiado en el presente trabajo de tesis se observó una asociación estadísticamente significativa entre porcinos y el genotipo G7, corroborando lo descripto anteriormente en la provincia.

La distribución geográfica de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en la provincia de Neuquén fue marcadamente heterogénea, en concordancia con lo observado previamente por Pierangeli (2013). En los departamentos de Chos Malal, Minas y Confluencia se encontró la mayor variedad de especies y genotipos (Figura 21). Los caprinos, ovinos y porcinos albergaron QH fértiles, lo que demostró su participación en ciclos activos simultáneos de transmisión de la EQ.

El estudio de la diversidad de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato descripta en la provincia de Neuquén demuestra que existe simpatría: distintos HI susceptibles a la infección que comparten un mismo territorio. Estos HI fueron introducidos al país desde distintas regiones del mundo, trayendo consigo diferentes genotipos de *E. granulosus* sensu lato. Las condiciones geográficas y climáticas de Neuquén podrían condicionar la distribución de los HI y los genotipos de *E. granulosus* sensu lato. El modelo de trashumancia, utilizado por los productores del norte neuquino para la cría de ganado, sería un aspecto a tener en cuenta en la transmisión de la EQ. Este modelo se practica especialmente en los departamentos de Chos Malal y Minas, lugares donde se encontró la mayor variedad de especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato. El modelo de trashumancia tiene características únicas en Argentina, e implica el traslado de toda la familia de los productores, los animales de cría (caprinos, ovinos y bovinos), junto con los perros de arreo, desde la veranada (valles de altura) a la invernada (en los valles inferiores y mesetas) y viceversa, en busca de las mejores pasturas para los animales (Bendini *et al.*, 2004). Los arreos se realizan por “callejones” por los que transitan numerosos arrieros con sus animales. En los descansos los animales comparten el agua de los arroyos con los humanos y se faenan animales para consumo familiar. En esas circunstancias, los perros acceden con gran facilidad a las vísceras con QH del ganado faenado, lo que aumenta el

riesgo de transmisión de la EQ. Los factores de riesgo que conlleva la trashumancia deberían ser evaluados para determinar la posible asociación con la transmisión de la EQ en la provincia de Neuquén.

En este trabajo de tesis, la diversidad genética, filogeografía y la estructura de la población de *E. granulosus* sensu lato en ganado fue investigada por primera vez en la provincia de Neuquén. La información fue obtenida mediante la secuenciación parcial del gen mitocondrial *cox1*, que históricamente se había demostrado que presentaba una variabilidad intraespecífica y se había utilizado para el estudio de la estructura de la población de *E. granulosus* sensu lato de otras partes del mundo (Bowles *et al.*, 1992; Nakao *et al.*, 2010; Casulli *et al.*, 2012; Yanagida *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2019). El análisis de las secuencias de *E. granulosus* sensu lato mostró baja diversidad haplotídica y nucleotídica, esto puede deberse a que, en ganado, sólo se estudió la secuenciación parcial del gen mitocondrial *cox1*. Se encontraron tres haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto G1, que habían sido descritos en Neuquén previamente por Soriano *et al.* (2010) y Pierangeli (2013). El haplotipo más común encontrado en este trabajo fue el genotipo G1 originalmente descrito por Bowles *et al.* (1992), siendo el haplotipo más común y extendido a nivel mundial (Kamenetzky *et al.*, 2002; Vural *et al.* 2008; Soriano *et al.*, 2010). Los otros dos haplotipos encontrados en menor frecuencia correspondían a G1nqnB y G1nqnD, descritos previamente en Neuquén por Soriano *et al.* (2010), Soriano (2011) y Pierangeli (2013). El haplotipo G1nqnB fue reportado, en menor frecuencia que el genotipo G1 originalmente descrito por Bowles *et al.* (1992), en Irán y Turquía, mientras que el genotipo G1nqnD fue descrito sólo en la provincia de Neuquén (Vural *et al.*, 2008; Soriano, 2011; Pierangeli, 2013).

Los haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto encontrados en este estudio no revelaron una estructura filogeográfica sistemática aparente en la provincia de Neuquén. El análisis de la red de haplotipos reveló una estructura simple, con sólo tres haplotipos (Figura 22). El genotipo G1 original fue el haplotipo central de la red y el más numeroso, del cual se

desprendían los restantes. Estos resultados son coherentes con los observados por otros autores en otras regiones del mundo (Farhadi *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2019). Además, cabe destacar que el haplotipo central es predominante en la población mundial, lo que sugiere que un linaje particular de *E. granulosus* sensu stricto está ampliamente extendido en poblaciones geográficamente no relacionadas. Nakao *et al.* (2010) sugirieron que la mutación de los haplotipos fundadores de la secuencia parcial del gen *cox1* no era ventajosa, porque las secuencias de aminoácidos del fundador eran las mismas que las de otros haplotipos, como el haplotipo G1nqnB encontrado en ganado de la provincia de Neuquén. Sin embargo, se contradice en el caso del haplotipo G1nqnD que presentó una sustitución no sinónima; este cambio en la secuencia de la proteína podría tener implicancias en la especificidad por el hospedador, antigenicidad, patogenicidad, entre otras (Romig *et al.*, 2015).

La baja diversidad de haplotipos y diversidad nucleotídica para las secuencias de 366 pb de *E. granulosus* sensu stricto obtenidas en este trabajo podrían ser un indicativo de la falta de expansión de la población, que además está respaldado por la estructura de la red de haplotipos que incluía solo tres haplotipos, con un haplotipo principal común. En este trabajo sólo se encontraron tres de los cinco haplotipos descritos previamente en la provincia de Neuquén. Esto puede ser debido a que el número de aislamientos provenientes de ganado analizados en este trabajo, fue menor que los de Soriano *et al.* (2010) y Pierangeli (2013). Tanto el índice de neutralidad de Tajima's D como Fu's Fs fueron negativos, sin embargo no fueron significativos, por lo tanto no es consistente con una población en expansión (Tajima, 1989).

El análisis de las secuencias de *E. canadensis* también mostró cierta diversidad. Se encontraron los genotipos G6 y G7, y un nuevo haplotipo de G7: G7nqn01. Las sustituciones de bases nucleotídicas en el haplotipo G7nqn01 no implicaron cambios en la secuencia de aminoácidos. Los genotipos encontrados en este trabajo corresponden a los genotipos G6 y G7 originalmente descrito por Bowles *et al.* (1992). En el año 2002, Kamenetzky *et al.* describieron un haplotipo de *E. canadensis* G7, diferente al descrito por Bowles *et al.*

(1992), en un cerdo de la provincia de Santa Fe, Argentina; sin embargo, su secuencia no coincide con el haplotipo de G7 encontrado en este trabajo. El análisis de la red de haplotipos de *E. canadensis* reveló una estructura simple similar a la red de haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto (Figura 23). El análisis de la secuencia parcial del gen *cox1* (366 pb) muestra que la distancia genética entre los genotipos G6 y G7 es muy pequeña, ya que se diferencian en un solo nucleótido. Esta afinidad entre los dos genotipos también fue confirmada mediante el análisis del genoma mitocondrial completo (Nakao *et al.*, 2013). Existe controversia sobre si estos dos genotipos son distintos o son microvariantes que reflejan diferentes dispersiones geográficas (Addy *et al.*, 2017). En este trabajo de tesis se encontraron numerosas diferencias fenotípicas que avalan su existencia como genotipos diferentes que serán discutidas más adelante.

Los índices de diversidad de haplotipos y diversidad nucleotídica de *E. canadensis* fueron mayores que los de *E. granulosus* sensu stricto. Debido al bajo polimorfismo genético observado en la población de *E. canadensis* en Neuquén, es probable que la población haya experimentado un evento de cuello de botella y una expansión de la población. Los índices de neutralidad de Tajima's D y Fu's Fs obtenidos en este estudio para las secuencias de *E. canadensis* fueron positivos, sin embargo sólo el índice de Fu's Fs fue significativo. Los valores positivos significativos de Fu's Fs indican un exceso de alelos de frecuencia intermedia en una población y pueden resultar del equilibrio de la selección, los cuellos de botella de la población o la presencia de la estructura de la población (Fu, 1997). Hasta el momento, en América del Sur existe solo un estudio filogeográfico de *E. canadensis* realizado recientemente en Bolivia donde se describió la presencia de *E. canadensis* G7 en solo tres quistes de cerdo (Ali *et al.*, 2020). Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sobre una posible expansión, sería interesante llevar a cabo más estudios en otros países de América del Sur para analizar la dispersión y diversidad de *E. canadensis*.

Se ha sugerido que la localización anatómica de los quistes puede depender no solamente de factores del HI, sino también del genotipo del parásito (Eckert *et al.*, 2001).

Los estudios sobre la localización anatómica de los QH según el HI en distintos países presentan resultados muy dispares, lo que sugiere que podrían intervenir factores a nivel local que influirían en el mejor desarrollo del parásito en un órgano determinado (Dueguer & Gilman, 2001; Andresiuk *et al.*, 2009). Además, estos resultados dispares pueden ser debido a que generalmente los estudios sobre localización anatómica de los QH no tienen en cuenta el genotipo con el cual está infectado el HI. Algunos factores propuestos se relacionan con procesos fisiológicos de la infección, como por ejemplo, el predominio de infección pulmonar observado en ovinos de la región andina de Perú, donde se facilitaría la infección por la dilatación capilar en pulmones del HI como adaptación fisiológica a vivir a las grandes alturas de los Andes (Dueguer & Gilman, 2001).

En el presente trabajo la localización anatómica más frecuente de los QH en el ganado fue pulmonar, seguida por hepática. Asociaciones estadísticamente significativas se observaron en la localización según el HI involucrado: los quistes de caprinos y bovinos fueron mayormente pulmonares y los de porcinos hepáticos. Aproximadamente 2/3 de los QH de ovinos se localizaron en hígado y el resto en pulmón (Tabla 5). La asociación entre la localización pulmonar y los caprinos y localización hepática y los porcinos es igual a la descrita por Soriano *et al.* (2010). Sin embargo, en ese estudio describieron una asociación de QH de ovinos con la localización pulmonar, presentando diferencias con este trabajo de tesis. Sería interesante realizar más estudios para determinar si estas diferencias son debidas al haplotipo con el cual está infectado el ganado ovino.

Los QH fértiles producen PSC y son capaces de continuar el ciclo biológico del parásito infectando al HD. Por lo tanto, los valores de fertilidad y viabilidad de los QH desarrollados en un HI indican la participación de ese HI en el ciclo biológico. Si el HI es susceptible a la infección pero los QH son infértiles, el ciclo se interrumpe y no hay transmisión a partir de ese HI.

La evaluación de la fertilidad y la viabilidad de los QH en el presente estudio mostró que los HI analizados presentaron QH fértiles, lo que indica que los caprinos, ovinos, porcinos y bovinos participan activamente en la transmisión de *E. granulosus* sensu lato en

la provincia de Neuquén. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los QH provenientes de los cuatro HI. Los QH de porcinos fueron mayormente fértiles con elevada viabilidad, coincidiendo con lo descrito previamente por Soriano *et al.* (2010) (Tabla 6). Los QH de caprinos y de ovinos presentaron una fertilidad de 65,6% y 66,7% respectivamente, y viabilidad promedio de 64,5% y 42,1%, respectivamente. La mayor parte de los quistes de bovinos fueron infértiles, coincidiendo con lo descrito previamente por Pierangeli (2013), que describió que el 10,0% de los QH de bovinos eran fértiles. Teniendo en cuenta que en Neuquén el ganado bovino es menos abundante que el caprino y el ovino, y que los quistes detectados fueron mayormente infértiles, la participación de los bovinos en la transmisión de la EQ en la provincia sería menos relevante.

En el análisis de distribución de genotipos en relación con la localización anatómica de los quistes para cada HI, se observó que en los caprinos existe un marcado tropismo pulmonar para los QH de *E. canadensis* G6. Los únicos dos QH de caprinos originados por *E. granulosus* sensu stricto G1 presentaban localización hepática. Los porcinos infectados con *E. canadensis* G7 presentaban el 100% de los QH localizados en el hígado, mientras que en el único cerdo infectado con *E. granulosus* sensu stricto G1 el QH estaba localizado en el pulmón (Tabla 7). Estos resultados concuerdan con otros estudios que refieren la localización preferentemente pulmonar para los QH de *E. canadensis* G6 y hepática para los QH de *E. canadensis* G7, independientemente del HI infectado (Moro *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2010; Addy *et al.*, 2012; Cucher *et al.*, 2016). Estas diferencias fenotípicas entre G6 y G7 apoyan el hecho de que sean considerados como genotipos diferentes.

La localización de los QH de *E. granulosus* sensu stricto G1 en ovinos de Neuquén fue de 2/3 de los QH en hígado y el resto en pulmón (Tabla 7). Estos resultados difieren con los resultados obtenidos previamente en la provincia de Neuquén, donde se reportaron mayores infecciones pulmonares en ovinos (Pierangeli, 2013). Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados en distintas regiones del mundo la localización hepática es la más frecuente como, por ejemplo Marruecos, Kenia, China, entre otros (Azlaf *et al.*, 2006; Addy *et al.*, 2012; Nusilaiti & Yan Hao, 2016; Deplazes *et al.*, 2017). La diferencia en la localización

anatómica del QH podría estar dada por los haplotipos que infectan los ovinos. Pierangeli (2013) reportó que el 51,5% de los QH de ovinos de Neuquén pertenecían a G1nqnB y todos presentaban localización pulmonar, mientras que el 33,3% de los QH G1 original tenían localización hepática y sólo el 9,1% localización pulmonar. Soriano *et al.* (2010) reportaron que el 78,6% de los quistes de ovinos pertenecían al haplotipo G1nqnB y tenían localización pulmonar. En este trabajo de tesis, sólo el 11,1% de los QH eran G1nqnB y presentaban también localización pulmonar; mientras que el 83,3% de los QH pertenecían al haplotipo G1 original y el 66,7% de estos QH presentaba localización hepática. Estos resultados sugieren una estrecha relación haplotipo-localización anatómica, al menos en ganado ovino, lo cual constituye un resultado novedoso. A pesar de los numerosos estudios publicados sobre diversidad de haplotipos, hasta el momento no se había descrito ninguna relación con la expresión fenotípica de dicha variabilidad.

La localización anatómica de los QH de *E. granulosus* sensu stricto G1 en bovinos de Neuquén fue preferentemente pulmonar. Estos resultados son comparables a los reportados previamente por Soriano (2011) y Pierangeli (2013) en la provincia de Neuquén, donde observaron aproximadamente 95,0% de localización pulmonar en QH G1 en bovinos. Estos datos también concuerdan con los datos de QH de la provincia de Buenos Aires, donde el 98,4 % de los quistes del genotipo G1 en bovinos fueron de localización pulmonar (Andresiuk *et al.*, 2009; 2013). Estos porcentajes son superiores a los obtenidos por de la Rue *et al.* (2006) en bovinos de Brasil, que refieren también predominio pulmonar pero en el 69,2%. Los resultados de este trabajo de tesis otorgan un fuerte sustento a la influencia del genotipo sobre la localización anatómica, que es una expresión fenotípica producida por las diferencias genotípicas.

La distribución de los genotipos según el HI, considerando además la localización anatómica y la fertilidad de los QH, se realizó para caracterizar la infección en cada tipo de HI y establecer su participación en la transmisión de la EQ en Neuquén. Mediante este enfoque, se pudo demostrar en primer lugar, que para cada HI los QH fértiles correspondían

a una sola especie y genotipo y generalmente a una determinada localización anatómica (Tabla 7).

El análisis de los QH de origen caprino indicó que todos los QH de localización pulmonar correspondían a *E. canadensis* G6 y tenían una elevada fertilidad y viabilidad mientras que los QH de localización hepática eran infértiles y producidos por *E. granulosus* sensu stricto G1.

El genotipo *E. canadensis* G6 fue descrito originalmente en camellos (Bowles *et al.*, 1992). Sin embargo, otros HI domésticos (como caprinos, ovinos, bovinos y porcinos) y los humanos pueden también infectarse con este genotipo en aquellas regiones donde hay camellos infectados con el genotipo G6 (Romig *et al.*, 2017). Si bien en la provincia de Neuquén hay camélidos (guanacos), la infección echinococócica en estos posibles HI no ha sido aún evaluada en esta provincia. Soriano *et al.* (2010) determinaron que las cabras actúan como un reservorio de *E. canadensis* G6 en la provincia de Neuquén. Infecciones con *E. canadensis* G6 en bovinos y humanos también fueron descritas previamente en Neuquén (Kamenetzky *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2015).

Con respecto a los QH de origen ovino, se observó que todos los QH correspondían a *E. granulosus* sensu stricto G1 y los QH de localización hepática presentaban mayor fertilidad que los quistes de localización pulmonar. Estos resultados coinciden con lo descrito por Pierangeli (2013), donde se observó que el 82,0% de los QH hepáticos eran fértiles, mientras que solamente el 50,0% de los quistes pulmonares eran fértiles. Los resultados de este trabajo de tesis difieren de lo descrito por Soriano *et al.* (2010), quienes describieron que el 100,0% de los QH de ovinos que correspondían a G1nqnB eran pulmonares y presentaban una fertilidad de 78,6%; probablemente, como se discutió anteriormente, debido a que los haplotipos de G1 involucrados en cada caso fueron diferentes.

Los datos epidemiológicos sugieren que *E. granulosus* sensu stricto G1 está particularmente bien adaptada a la oveja como HI, lo que se refleja en alta prevalencia y tasas elevadas de fertilidad de los QH (Cardona & Carmena, 2013; Deplazes *et al.*, 2017;

Romig *et al.*, 2017). Sin embargo, los ovinos son susceptibles también a la infección por otras especies y genotipos del complejo *E. granulosus* sensu lato, como *E. granulosus* sensu stricto genotipo G3, *E. ortleppi* genotipo G5 y *E. canadensis* genotipos G6 y G7 (Bowles *et al.*, 1992; Dinkel *et al.*, 2004; Varcasia *et al.*, 2007; Snàbel *et al.*, 2009, Latif *et al.*, 2010; Soriano *et al.*, 2010; Konyaev *et al.*, 2013; Umhang *et al.*, 2014a; Amer *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, el total de los QH porcinos correspondientes a *E. canadensis* G7 fueron de localización hepática, fértiles y presentaban elevada viabilidad. Este hallazgo confirma el rol de los cerdos en un ciclo activo de transmisión de EQ en la provincia de Neuquén descrito previamente por Soriano *et al.* (2010) y Pierangeli (2013). El cerdo es el HI de preferencia del genotipo G7. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró un cerdo infectado con *E. granulosus* sensu stricto G1. Este quiste presentaba localización pulmonar y era infértil. El genotipo G1 puede infectar al ganado porcino pero generalmente produce QH infértiles en estos HI, por lo tanto los cerdos juegan un pequeño papel en la transmisión de *E. granulosus* sensu stricto G1 (Romig *et al.*, 2017).

El análisis de la fertilidad de los QH de origen bovino mostró que aunque este HI es altamente susceptible a la infección con *E. granulosus* sensu stricto G1, la mayor parte de los QH producidos por este agente parasitario fueron infértiles en estos HI y por lo tanto el ganado bovino no tendría un rol fundamental en el mantenimiento del ciclo de *E. granulosus* sensu stricto G1 en Neuquén. Resultados similares se describieron en la provincia de Buenos Aires donde sólo el 11,5% de los QH G1 en bovinos eran fértiles (Andresiuk *et al.*, 2013). Los reportes acerca de la capacidad de esta especie y genotipo para generar QH fértiles en ganado bovino son variables. La fertilidad de los QH es baja en la mayoría de los estudios (menor al 20,0%), pero puede alcanzar el 75,0% (Latif *et al.*, 2010; Romig *et al.*, 2017). Existen reportes de bovinos infectados con *E. ortleppi* G5 en las provincias de Santa Fe y Buenos Aires, sin embargo no se encontró ningún aislamiento G5 en la provincia de Neuquén (Cucher *et al.*, 2016).

De acuerdo a los resultados del presente trabajo que relacionan la fertilidad con el genotipo del QH se podría decir que: los ovinos actúan como un reservorio de *E. granulosus*

sensu stricto G1, los caprinos como un reservorio de *E. canadensis* genotipo G6 y los porcinos como un reservorio de *E. canadensis* genotipo G7 en la provincia de Neuquén; constituyendo los ciclos activos de transmisión de la echinococcosis en la provincia.

5.2. ESTUDIO 2: Caracterización molecular, biológica y clínica de quistes hidatídicos humanos de la provincia de Neuquén.

En este trabajo de tesis se realizó la caracterización molecular, fenotípica y clínica de QH obtenidos de humanos sometidos a cirugía por hidatidosis. Existen escasos estudios a nivel mundial donde se relacionen la localización, fertilidad, viabilidad y tamaño del QH con la especie y genotipo de *E. granulosus* sensu lato. Este es el primer trabajo en América que relaciona todas estas variables con el genotipo del parásito.

La IAP obtenida según los datos de denuncias de casos al Ministerio de Salud de la provincia de Neuquén durante el período 2013-2018 fue de 8,6/100.000 habitantes. Esta tasa podría estar subestimada y el número de casos podría ser mayor, ya que solo refleja casos sintomáticos que requieren atención médica o cirugía y representa una pequeña proporción del número real de casos, debido a varias razones. Primero, la EQ es una enfermedad crónica, con un curso de desarrollo lento y casos asintomáticos frecuentes que pueden representar hasta el 60% del número total de casos (Pawlowski *et al.*, 2001; Pierangeli *et al.*, 2007). En segundo lugar, aunque la EQ es una enfermedad de notificación obligatoria en Argentina, no se informan todos los casos. Mientras que los datos de los hospitales públicos se registran sistemáticamente en Neuquén, los hospitales privados frecuentemente no notifican a las autoridades sanitarias. Por lo tanto, las deficiencias en los registros oficiales también deben tenerse en cuenta. A pesar de las limitaciones mencionadas anteriormente, los datos de IAP siguen siendo una herramienta útil para evaluar la situación epidemiológica regional de la enfermedad (Craig *et al.*, 2017).

En este trabajo de tesis se observó que la distribución de la EQ en humanos de Neuquén fue heterogénea, al igual que lo observado por Pierangeli *et al.* (2007) durante el período 1995-2004. La EQ es considerada una enfermedad rural debido a las características del ciclo de transmisión, que involucra animales ungulados domésticos y perros (McManus *et al.*, 2003). Sin embargo, en este trabajo de tesis se obtuvieron por primera vez QH de pacientes provenientes de distintas localidades, tanto rurales como urbanas, de todos los departamentos de la provincia de Neuquén. El mayor número de casos por 100.000

habitantes se observó en los departamentos del oeste de la provincia de Neuquén, donde el entorno natural incluye altas mesetas y montañas, y las actividades rurales son más frecuentes (Tabla 9). El mayor número de casos por 100.000 habitantes se encontró en el departamento Huiliches, ubicada al suroeste de la provincia de Neuquén. Este resultado concuerda con los hallazgos de Roccia *et al.* (2018) quienes reportaron que algunas localidades, como Junín de los Andes, representan un punto geográfico de alto riesgo en la provincia de Neuquén, debido al elevado número de casos reportados por screening ecográfico en niños (indicador de transmisión reciente de EQ) y por muestras de coproantígeno positivas en materia fecal canina.

Otros departamentos con elevada número de casos por 100.000 habitantes fueron los departamentos de Loncopué, Picunches, Aluminé y Minas, donde predominan poblaciones rurales que viven en comunidades pequeñas y crían cabras para su subsistencia, principalmente bajo un modelo de producción trashumante (Tabla 9). Existen reportes de alta prevalencia de EQ en comunidades trashumantes en todo el mundo, debido a condiciones socioeconómicas, particularmente bajos niveles de educación, falta de conocimiento sobre la enfermedad y su transmisión, malas condiciones sanitarias, intercambio de recursos hídricos con perros y faenas en los hogares. Las migraciones humanas y el clima también contribuyen a la epidemiología de la EQ en comunidades trashumantes (Macpherson, 2001). Además, los factores culturales en conjunto con los escasos recursos económicos y la falta de combustible (indispensable para la cocción de alimentos), hacen que la alimentación de los perros con vísceras crudas sea un hábito generalizado en las comunidades rurales de Neuquén (Pierangeli *et al.*, 2007).

La presencia de casos humanos en localidades urbanas de la provincia de Neuquén, indican que la EQ no es sólo una problemática de localidades rurales en esta provincia. La ciudad de Neuquén, capital de la provincia, fue la localidad con mayor cantidad de pacientes con EQ, aunque mostró un bajo número de casos por 100.000 habitantes, debido a la cantidad de habitantes que presenta (Tabla 9). La presencia de casos humanos en esta ciudad puede explicarse por diferentes razones. En primer lugar, podría deberse a la

migración de personas, es decir traslado de las personas desde áreas rurales a las áreas urbanas (Dopchiz *et al.*, 2009). Puede ser que estas personas traigan con ellos sus costumbres de faena domiciliaria y de alimentar a los perros con vísceras crudas, creando un área en su entorno que facilita la transmisión de la EQ. En segundo lugar, es posible que la población urbana haya estado en contacto con los huevos de *E. granulosus* sensu lato en la ciudad, donde se registraron 7700 perros sueltos en el año 2019 (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020). Roccia *et al.* (2018) reportaron la presencia de antígenos de *E. granulosus* sensu lato en muestras de materia fecal canina en espacios públicos en ciudades de la provincia de Neuquén, como Neuquén, Zapala, Villa la Angostura, Chos Malal, Junín de los Andes, entre otras. En los últimos años creció la producción de cerdos en las áreas periurbanas de la ciudad de Neuquén (Ministerio de Producción y Turismo, 2020). Algunos productores realizan la faena de cerdos, y en menor medida de ovinos y caprinos, de manera clandestina y por lo tanto los perros tienen acceso a las vísceras crudas descartadas. La distancia entre el área periurbana y urbana es escasa, por lo tanto los perros infectados podrían moverse de un área a la otra esparciendo los huevos de *E. granulosus* sensu lato. Además, puede ser que las personas que viven en zonas urbanas adquieran la enfermedad al concurrir a zonas rurales turísticas en ocasión de vacaciones/recreación/actividad deportiva, algo muy frecuente en la población de Neuquén.

Al igual que en el ganado, la epidemiología molecular de *E. granulosus* sensu lato en humanos de Argentina es compleja debido a la presencia de distintas especies y genotipos. Los reportes correspondientes a aislamientos en humanos de diferentes provincias del país, indican la presencia de *E. granulosus* sensu stricto genotipos G1 y G2; *E. ortleppi* genotipo G5 y *E. canadensis* genotipo G6 (Rosenzvit *et al.*, 1999; Kamenetzky *et al.*, 2002; Guarnera *et al.*, 2004; Cucher *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017). Es interesante destacar que en Argentina se describieron por primera vez casos humanos causados por los genotipos G2 y G6, que eran considerados no infectivos para el humano hasta ese momento (Rosenzvit *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se evaluaron las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato presentes en 149 QH de 108 pacientes de la provincia de Neuquén, mediante el análisis de la secuencia parcial del gen mitocondrial *cox1* del estadio metacestode del parásito. Este trabajo de tesis es el trabajo más importante en número de pacientes estudiados con genotipificación de los QH de Argentina. La genotipificación de los aislamientos demostró la presencia de las siguientes especies y genotipos en Neuquén: *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1 con cuatro haplotipos (el haplotipo G1 descrito originalmente por Bowles *et al.* (1992), G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE), *E. granulosus* sensu stricto genotipo G3, *E. canadensis* genotipo G6 y *E. canadensis* genotipo G7 (Tabla 11). Estos resultados corroboran la presencia de G1 y G6 en humanos de Neuquén publicados previamente por Kamenetzky *et al.* (2002). Además, en este trabajo de tesis se describe por primera vez la infección en humanos por el genotipo G3 en Argentina y por el genotipo G7 en América, datos publicados por Debiaggi *et al.* (2017).

A diferencia de lo descrito por Kamenetzky *et al.* (2002), en este trabajo de tesis se genotipificaron 149 QH y se encontró mayor cantidad de QH humanos de *E. granulosus* sensu stricto G1 que de *E. canadensis* G6. Esto puede ser explicado porque Kamenetzky *et al.* (2002) sólo analizaron 21 muestras en humanos de la provincia de Neuquén. *Echinococcus granulosus* sensu stricto es el agente etiológico con mayor cantidad de casos a nivel mundial siendo G1 el genotipo identificado con mayor frecuencia (72,9%). El porcentaje de QH G1 (59,1%) en la provincia de Neuquén fue menor con respecto a lo descrito a nivel mundial (Alvarez Rojas *et al.*, 2014; Cucher *et al.*, 2016). Otros países de América del Sur, como Chile y Perú, presentaron infecciones en humanos tanto con *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G6, sin embargo se han reportado porcentajes de infección con G1 de aproximadamente 95,0%, siendo un valor muy superior al descrito en este trabajo para la provincia de Neuquén (Cucher *et al.*, 2016).

A pesar de que las infecciones con *E. granulosus* sensu stricto G1 predominaron sobre las infecciones con *E. canadensis* G6, el porcentaje de infecciones con G6 fue de 37,6%, valor que triplica al descrito para la distribución mundial (12,2%) (Cucher *et al.*,

2016). El elevado porcentaje de humanos infectados con *E. canadensis* G6 podría estar relacionado con el modelo de trashumancia llevado a cabo en la provincia de Neuquén para la cría de cabras y con que el ganado caprino es el más numeroso en Neuquén. Este modelo podría aumentar el riesgo de infección humana por *E. canadensis* G6, ya que las cabras son el principal reservorio de este genotipo en Neuquén (Soriano *et al.*, 2010; Debiaggi *et al.*, 2017). Como consecuencia existe una mayor presión de infección debido a la mayor disponibilidad de QH de caprinos G6 que de ovinos G1.

La secuencia de *E. granulosus* sensu stricto G3 descrita en este trabajo es el primer aislamiento de esta especie y genotipo en un humano de Argentina. Esta secuencia coincide con la encontrada previamente en un ovino del norte de la provincia de Neuquén por Soriano *et al.* (2010), único caso de un HI infectado con este genotipo en Sudamérica. La secuencia del genotipo G3 del humano y del ovino procedían de Chos Malal, departamento localizado en el norte de Neuquén. La detección de *E. granulosus* sensu stricto G3 en un humano sugiere que este genotipo participa de un ciclo sinantrópico en Neuquén. La secuencia del genotipo G3 encontrada en Neuquén es homóloga al primer reporte en búfalos de la India (Bowles *et al.*, 1992). La información epidemiológica del genotipo G3 es más limitada respecto del resto de los genotipos. Hasta el momento, la secuencia del genotipo G3 fue descrita previamente en humanos de Brasil, China, India, Italia, Turquía, Irán y Túnez (Deplazes *et al.*, 2017).

El análisis de secuencia de los productos de PCR realizado en este trabajo de tesis permitió describir por primera vez un caso de infección humana con *E. canadensis* G7 en Argentina y en América, lo que confirma el papel de este genotipo como agente causante de infección en humanos, resultado publicado en Debiaggi *et al.* (2017). La secuencia del genotipo G7 mostró una identidad completa de *cox1* y *nad1* con secuencias publicadas descritas previamente en porcinos de Neuquén (Soriano *et al.*, 2010), en porcinos y bovinos de otras provincias de Argentina y otros países (Kamenetzky *et al.*, 2002; Beato *et al.*, 2013; Konyaev *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2014) y en humanos de China (Zhang *et al.*, 2014). Se notificaron casos humanos debido al genotipo G7 en países de Europa central y

oriental, Asia y Sudáfrica, asociados con la transmisión porcina (Dybicz *et al.*, 2013; Álvarez Rojas *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Deplazes *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta el momento no había informes de infección humana con *E. canadensis* G7 en las Américas (Cucher *et al.*, 2016; Deplazes *et al.*, 2017).

Existen pocos reportes de coinfecciones con *E. granulosus* sensu lato en HI en el mundo. Se han reportado coinfecciones en Francia y en la República de Moldavia, donde los genotipos G1 y G3 pertenecientes a la especie *E. granulosus* sensu stricto fueron identificados en pulmones e hígado de ovinos y bovinos (Umhang *et al.*, 2013, 2014a). Pierangeli (2013) describió en la provincia de Neuquén la infección simultánea en un mismo animal con múltiples especies y/o genotipos de *E. granulosus* sensu lato en ovinos y bovinos. En un ovino y un bovino de Chile se encontraron hasta cinco haplotipos distintos de *E. granulosus* sensu stricto en dos animales diferentes (Hidalgo *et al.*, 2020). Oudni-M'rad *et al.* (2016) reportaron por primera vez una coinfección en humanos, que involucraba a *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G6 en un niño de Túnez. En este trabajo de tesis se describe por primera vez en las Américas, un paciente que presenta coinfección con *E. granulosus* sensu stricto G1nqnD y *E. canadensis* G7. Se trata de una paciente que presentaba tres QH en el hígado y que se sometió a dos cirugías. En la primer cirugía, se extrajeron dos QH que fueron caracterizados genéticamente como *E. granulosus* sensu stricto G1nqnD y *E. canadensis* G7, respectivamente. La segunda cirugía se llevó a cabo tres meses después, para extraer otro QH del hígado que también fue caracterizado como *E. granulosus* sensu stricto G1nqnD. Este resultado demuestra que la coinfección humana es un hecho que debe tenerse en cuenta, especialmente en regiones endémicas donde diferentes especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato están presentes con ciclos de vida simpátricos.

La presencia de una coinfección podría ser el resultado de infecciones sucesivas del animal o el humano, o simultáneas (Umhang *et al.*, 2014a). La primera propuesta es factible, ya que al tratarse de una zona endémica, no existe limitación por la inmunidad del HI para la adquisición de nuevas infecciones (Gemmell & Roberts, 1995). Por lo tanto, habiendo

disponibilidad en el ambiente de huevos de distintos genotipos y/o haplotipos de *E. granulosus* sensu lato, los HI susceptibles podrían adquirir infecciones con cualquiera de ellos. La capacidad de desarrollo de QH fértiles y, por lo tanto, la continuidad del ciclo, dependerá de la interacción del parásito con cada hospedador. En cuanto a la propuesta de infecciones simultáneas, podría ser también posible, ya que los perros podrían albergar los parásitos adultos de distintos genotipos y/o haplotipos, luego de ingerir QH de diferentes genotipos y/o haplotipos de animales que fueron faenados en el mismo acto. Además, pueden coexistir en un mismo espacio geográfico perros infectados con diferentes genotipos y/o haplotipos. Hasta el momento no existen reportes sobre la existencia de interacción entre los distintos genotipos de *E. granulosus* sensu lato. Por lo tanto, sería interesante llevar a cabo estudios en ganado y humanos con coinfecciones para determinar si la infección de un hospedador sin salida o un HI con un determinado genotipo favorece o desfavorece la coinfección con otro genotipo.

La distribución geográfica de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en humanos de la provincia de Neuquén fue marcadamente heterogénea, en concordancia con lo observado en el ganado caprino, ovino, porcino y bovino en este trabajo de tesis (Figura 26 y Tabla 12). En el departamento de Minas se encontró la mayor diversidad de especies y genotipos, coincidiendo con lo que se describió en los HI en este trabajo de tesis. Sin embargo, en humanos se encontraron los genotipos G1, G6 y G7, mientras que en ganado de este departamento se describieron los genotipos G1 y G6. A pesar de que la mayor parte de los QH de porcinos infectados con *E. canadensis* G7 se describieron en el departamento de Confluencia, el único quiste humano G7 que correspondió a un paciente con coinfección fue encontrado en el departamento de Minas, donde no predomina la producción de cerdos. Por lo tanto, puede ser que la persona haya viajado al departamento de Confluencia donde se podría haber infectado con *E. canadensis* G7. Además, es importante mencionar que no se obtuvieron QH de cerdos en el departamento de Minas en este trabajo de tesis y sería importante realizar más estudios en este departamento.

Como se mencionó anteriormente, el único humano con QH de *E. granulosus* sensu stricto G3 se encontró en el departamento de Chos Malal, siendo el mismo lugar donde se describió la única oveja descrita con infección por G3 en la provincia de Neuquén (Soriano, 2011; Pierangeli, 2013). Este hallazgo confirma la existencia de un ciclo activo de *E. granulosus* sensu stricto G3 en esa localidad. Al ser un genotipo poco frecuente en general y en América en particular, sería interesante poder realizar más estudios para determinar las causas de este hecho.

La mayor cantidad de QH pertenecientes a *E. granulosus* sensu stricto G1 se encontraron en pacientes de la localidad de Junín de los Andes correspondiente al departamento Huiliches, ubicada al suroeste de la provincia de Neuquén. La localidad de Junín de los Andes se caracteriza por la cría de ganado ovino y bovino y muy baja producción de ganado caprino. La presencia de mayor cantidad de pacientes infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1 en esta localidad puede ser debido a la mayor cantidad de ganado ovino y bovino, que actúan como reservorio de G1. Mientras que la mayor cantidad de QH pertenecientes a *E. canadensis* G6 se encontraron en pacientes de las ciudades de Neuquén y Zapala (Tabla 12).

En estudios recientes, realizados en distintas partes del mundo, se analizó la longitud completa del gen *cox1* para evaluar la microdiversidad de *E. granulosus* sensu lato. Por ejemplo, en Rusia, Konyaev *et al.* (2012a, 2013) describieron un total de 12 haplotipos de *cox1* de un total de 14 aislamientos de *E. granulosus* sensu stricto, mientras que Yanagida *et al.* (2012) describieron 44 haplotipos de *cox1* de un total de 120 aislamientos de China, Perú, Irán y Jordania. El haplotipo más frecuente encontrado por Yanagida *et al.* (2012) fue denominado Eg01, y fue el principal haplotipo en todas las poblaciones geográficas que estudiaron, además de ubicarse constantemente en el centro de las redes de haplotipos. Este resultado sugirió una historia evolutiva de *E. granulosus* sensu stricto en el que un subgrupo genético que incluye Eg01 podría haber sido seleccionado al comienzo de la domesticación del ganado, y luego se dispersó en todo el mundo a través de la difusión de la cría de ganado. Sin embargo, en un estudio realizado en Australia, Eg01 fue encontrado

en 9 de 37 aislamientos sugiriendo dos hipótesis: 1) existe un antiguo polimorfismo importado a Australia desde varios países en los últimos 200 años; 2) la diversidad evolucionó desde la importación del parásito antes del asentamiento europeo, por ejemplo, con la introducción de dingos hace unos 6000 años (Alvarez Rojas *et al.*, 2016). En Chile, se encontraron 36 haplotipos: el haplotipo más frecuente Eg01, dos de los haplotipos encontrados en Australia, un haplotipo descrito previamente en Rusia, un haplotipo descrito en un cerdo de Nepal y se describieron 31 haplotipos nuevos (Alvarez Rojas *et al.*, 2017; Hidalgo *et al.*, 2020). En Bolivia, se encontraron 9 haplotipos de *cox1* de un total de 30 aislamientos: el haplotipo más frecuente Eg01, uno de los haplotipos encontrados en Chile (EgCl03) y se describieron siete haplotipos nuevos (Ali *et al.*, 2020).

En este trabajo de tesis se investigó, por primera vez en la Argentina, la diversidad genética y la estructura de la población de *E. granulosus* sensu lato en humanos de la provincia de Neuquén. La información fue obtenida mediante la secuenciación completa del gen mitocondrial *cox1*, que históricamente se había demostrado que presentaba variabilidad intraespecífica y se había utilizado para el estudio de la estructura de la población de *E. granulosus* sensu lato de otras partes del mundo (Bowles *et al.*, 1992; Nakao *et al.*, 2010; Casulli *et al.*, 2012; Yanagida *et al.*, 2012). La comparación de las secuencias adquiridas en este estudio identificadas como *E. granulosus* sensu stricto con todas las secuencias similares depositadas en GenBank, permitió identificar nueve haplotipos de *cox1* del parásito (Tabla 13). De los haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto encontrados en humanos de Neuquén, tres haplotipos (EgNq01, EgNq02 y EgNq03) fueron descritos por primera vez en este trabajo de tesis. Estos hallazgos confirman la presencia del haplotipo Eg01 como el más frecuente. El haplotipo Eg32, encontrado en un humano de Plottier, fue descrito anteriormente en China por Yanagida *et al.* (2012) y el haplotipo EGp1 fue descrito en Nepal (Joshi & Yamasaki, 2009). Se comparó por primera vez la diversidad genética de la provincia de Neuquén con la de Chile, para evaluar posibles coincidencias y/o discrepancias. Interesantemente, los haplotipos EGp1, EgCl01, EgCl03 y EgCl20 habían sido descritos en Chile, algunos de ellos en el área vecina a la provincia de Neuquén (Alvarez

Rojas *et al.*, 2017). Esto puede ser debido al intercambio legal e ilegal de ganado a través de la cordillera de los Andes, que es la barrera natural que divide a ambos países. Además, el haplotipo EgCl03 también fue descrito en La Paz, Bolivia, a más de 3000 km de la provincia de Neuquén. Esto puede ser explicado porque después de la conquista del Imperio Inca, el ganado que llegó a América desde España se concentró principalmente en Perú, desde donde se distribuyó a Bolivia, Chile y Argentina. Desde el descubrimiento de la plata en Potosí (Bolivia), se sabía que esta ciudad era un centro para el ganado, parte del cual fue llevado hacia Argentina y Uruguay (Escobari de Querejazu, 1985). Por lo tanto, la distribución del ganado desde un lugar a otro podría explicar que regiones tan distantes presenten los mismos haplotipos. Sería interesante realizar estudios moleculares en las provincias del norte de Argentina, como Jujuy, Salta, Catamarca y Tucumán, para determinar qué haplotipos se encuentran en esa región.

El análisis de las secuencias de las muestras de *E. granulosus* sensu stricto mostró que las sustituciones de nucleótidos fueron no sinónimas y predicen la variabilidad de aminoácidos en la proteína *cox1*. Los haplotipos EgNq01 y EgNq03 descritos en este trabajo de tesis presentan uno o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cox1* del haplotipo Eg01 más frecuente (Tabla 13). Se ha propuesto que niveles similares de variabilidad genética tienen el potencial de afectar una variedad de aspectos de la interacción hospedador-parásito, o respuestas a agentes quimioterapéuticos o a vacunas. Por ejemplo, la variabilidad genética entre *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G6 en el gen que codifica la vacuna EG95 ya se ha demostrado que afecta la antigenicidad de la proteína (Alvarez Rojas *et al.*, 2013). *E. granulosus* sensu stricto es el principal complejo de genotipos responsable de la EQ en humanos; por lo tanto, es importante saber si existe algún haplotipo predominante que infecte a los humanos. Además, las diferencias entre las secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por los distintos haplotipos podría afectar la efectividad de la vacunación en el ganado y/o el tratamiento quimioterapéutico en humanos (Alvarez Rojas *et al.*, 2013). Las variaciones de las proteínas resultantes, debidas a cambios en las

secuencias de aminoácidos, constituyen expresiones fenotípicas de los cambios genéticos que presentan los diferentes haplotipos.

La red de haplotipos construida con las secuencias completas contiene al haplotipo Eg01 en su centro que muestra (Figura 28), como se describió anteriormente, que es un haplotipo ancestral que se ha expandido en todo el mundo después de la domesticación de hospedadores animales y la migración de humanos desde Medio Oriente (Yanagida *et al.*, 2012). Se supone que los perros de los barcos balleneros llevaron el parásito a Argentina desde países europeos. La EQ se conoce en el Río de la Plata (Argentina) desde las últimas décadas del siglo XIX. La actividad pesquera y la caza de ballenas se organizó en el Virreinato al finalizar el siglo XVIII, por lo que se instalaron factorías en las costas de Argentina y de Uruguay. Los perros transportados en buques balleneros infectaron a los ovinos y bovinos que se expandieron en el territorio nacional (Ordiozola & Pettinari, 1998). La red de haplotipos construida con las secuencias completas del gen *cox1* de *E. granulosus* sensu stricto de este trabajo de tesis y los disponibles en GenBank de países de América del Sur muestran que 26 haplotipos difieren en un solo nucleótido con el haplotipo central Eg01 (Figura 29). Aunque, no hay evidencia de que la población de *E. granulosus* sensu stricto difiere significativamente entre los países de América del Sur, se sugiere que la mayoría de los haplotipos de *cox1* se identifican de forma única con países particulares. El haplotipo Eg01 sigue siendo el más frecuente en América del Sur y se especula que podría haber sido la variante más frecuente del parásito que infecta al ganado y también a los perros importados a las Américas con la colonización española hace más de 500 años. El parásito y especialmente el que pertenece al haplotipo Eg01 se adaptó a una variedad de climas en América del Sur y a mutaciones aleatorias acumuladas a lo largo del tiempo (en el gen *cox1* y otros genes) que produjeron los que ahora se identifican como diferentes haplotipos del parásito (Ali *et al.*, 2020). Considerando que algunos haplotipos de *E. granulosus* sensu stricto descritos anteriormente en Chile y Bolivia estaban presentes en la provincia de Neuquén, sería necesario estudiar en quistes provenientes de ganado la secuencia

completa del gen *cox1* para *E. granulosus* sensu stricto en otros países de América del Sur para entender cómo se propagó este parásito en este continente.

Las diferencias regionales en la diversidad de haplotipos se han utilizado para inferir el origen de *E. granulosus* sensu stricto, con la hipótesis emergente de que el parásito presentó originalmente un ciclo de vida silvestre en Asia Occidental, que posteriormente involucró animales domésticos, extendiéndose a otras regiones a raíz de la domesticación del ganado (Yanagida *et al.*, 2012). La diversidad genética, siendo alta en Asia occidental y Medio Oriente, parece disminuir hacia Europa y Asia oriental (Casulli *et al.*, 2012; Yanagida *et al.*, 2012). En América del Sur se reportó baja diversidad de haplotipos en Perú, sin embargo, en Chile se describió una alta variabilidad (Yanagida *et al.*, 2012; Alvarez Rojas *et al.*, 2017). En este estudio, el valor del índice de diversidad de haplotipos es comparable con valores descritos previamente en diferentes animales de Chile, Bulgaria, China y Túnez (Casulli *et al.*, 2012; Boufana *et al.*, 2014; Alvarez Rojas *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2019). La alta diversidad de haplotipos observada en *E. granulosus* sensu stricto junto con la baja diversidad nucleotídica observada en los aislamientos humanos de la provincia de Neuquén fue similar a la reportada desde Túnez, Chile y China (Boufana *et al.*, 2014; Alvarez Rojas *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2019). El índice de neutralidad de Tajima's D obtenido en el estudio actual fue negativo, lo que sugiere un sesgo hacia la presencia de variantes nucleotídicas y una reciente expansión de la población. Además, el valor del índice de neutralidad Fu's Fs también fue negativo, lo que indicó que la incidencia de haplotipos raros fue menor a lo esperado bajo neutralidad. Los valores negativos de ambos índices de neutralidad podrían interpretarse como un aumento de la población después de un evento de cuello de botella desconocido y/o purificación de eventos de selección que podrían haber sucedido en el pasado (Nakao *et al.*, 2010; Boufana *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2019).

Recientemente, se realizaron estudios sobre la variabilidad intraespecífica de *E. canadensis* G6/G7 utilizando la secuencia completa del gen mitocondrial *cox1* de 1608 pb. Ito *et al.* (2013, 2014) describieron dos haplotipos de *cox1* en lobos y 29 haplotipos de *cox1* en humanos de Mongolia. En Rusia, se describieron dos haplotipos de *cox1* de *E. canadensis*

G6 provenientes de aislamientos de un humano, un reno y un lobo (Konyaev *et al.*, 2013). El haplotipo de *cox1* de *E. canadensis* G6 más frecuente encontrado por Addy *et al.* (2017) fue denominado Ec01, que correspondía al mismo descripto previamente en un humano de Rusia (Konyaev *et al.*, 2013). Addy *et al.* (2017) propusieron que G6 y G7 conformaban un cluster G6/G7 debido a que son muy pocos los cambios de bases nucleotídicas que diferencian a G6 y G7, y observaron haplotipos intermedios que unen estos dos genotipos. Este cluster conserva una variación intraespecífica sustancial y las subpoblaciones comparten polimorfismos y haplotipos ancestrales comunes. Sin embargo, el cluster de G6/G7 es claramente distinto de las secuencias de aislamientos de G8 y G10, siendo estos últimos genotipos distantes entre sí (Addy *et al.*, 2017).

Las secuencias completas identificadas en este estudio como *E. canadensis* G6 también se compararon con todas las secuencias similares depositadas en GenBank, lo que permitió identificar siete haplotipos *cox1* del parásito. De los haplotipos de *E. canadensis* encontrados en humanos de la provincia de Neuquén, cinco no habían sido descriptos previamente. El haplotipo Ec01, que es el más frecuentemente encontrado en todo el mundo, fue descripto en Rusia, Mongolia, Irán, Sudán, Nigeria, Mauritania y Kenia por Addy *et al.* (2017), y también fue el más común en este estudio, lo que sugiere que Ec01 fue el haplotipo fundador de esta especie en el momento de la domesticación de los animales. El haplotipo Ec22, encontrado en un humano de Centenario, fue descripto anteriormente en Sudán por Addy *et al.* (2017).

El análisis sobre la secuenciación parcial del gen *cox1* de *E. canadensis* G6 mostró que este genotipo no presentaba microvariantes respecto a la secuencia original descripta por Bowles *et al.* (1992). Sin embargo, en este trabajo de tesis se estudió por primera vez la secuencia completa del gen mitocondrial *cox1* para *E. canadensis* en Neuquén, lo que permitió describir la presencia de 7 haplotipos de un genotipo que hasta hace poco se consideraba muy estable. Este resultado refuerza los reportes que dicen que el uso de secuencias más largas del gen *cox1* permite la descripción de microvariantes de *E. granulosus* sensu lato en una resolución mayor que la establecida por Bowles *et al.* (1992).

Todos los haplotipos nuevos de *E. canadensis*, excepto el haplotipo EcNq03, descritos en este trabajo de tesis dan origen a proteínas con una o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cox1* del haplotipo Ec01 más frecuente (Tabla 14). Debido a que *E. canadensis* G6 es el segundo agente causante de EQ en humanos, es importante saber si esta variabilidad genética tiene el potencial de influir en la efectividad de las prácticas de manejo clínico, debido a las diferencias en la patogenicidad o la respuesta a los medicamentos como lo sugiere Romig *et al.* (2015). En este estudio sólo se obtuvo un aislamiento de cada haplotipo, por lo tanto se necesitarían más estudios moleculares para determinar cómo la variabilidad genética de *E. canadensis* podría influir en la infección.

Los valores de los índices de diversidad de haplotipos y nucleotídica dentro de *E. canadensis* G6 fueron bajos y comparables con la subpoblación de G6/G7 en Córcega, Francia. Estos valores indican que los aislamientos son poco polimórficos y además muestran una segregación duradera de la población de parásitos, además de un bajo nivel de polimorfismo en la población fundadora. La diversidad haplotídica y nucleotídica encontrada en humanos de Neuquén es menor de lo que se informó en diferentes HI del sur de África, África Oriental, Europa Oriental y Medio Oriente (Addy *et al.*, 2017). Los valores de los índices de diversidad haplotídica y nucleotídica no fueron comparados con los valores obtenidos en ganado en este trabajo de tesis debido a que las longitudes de las secuencias analizadas eran diferentes. El valor significativamente negativo de Tajima's D y Fu's Fs y la red de haplotipos de *E. canadensis*, que reveló una red "similar a una estrella", sugieren la expansión de la población después de la introducción de los haplotipos fundadores, que pareciera ser el haplotipo Ec01 (Figura 31). Debido a esta expansión, sería interesante realizar más estudios en otros países de América del Sur para evaluar la dispersión y diversidad de *E. canadensis* en el futuro. Las cabras y los camellos son los hospedadores más comunes para *E. canadensis* G6; sin embargo, no hay camellos en América del Sur y las cabras fueron transportadas al continente con la llegada de los europeos. Se cree que los primeros rebaños de cabras fueron llevados a Perú desde España

y luego extendidos hacia ambos lados de la cordillera de los Andes a principios del siglo XVIII. El último censo de ganado indicó que la población total de cabras en Argentina es de alrededor de 4 millones, de los cuales 940.835 se concentran en Neuquén, la provincia con la mayor población de cabras en el país (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020). El modelo trashumante realizado en Neuquén para la cría de cabras (Sapag, 2011) podría contribuir a la alta incidencia de EQ causada por este parásito en esta región específica de Argentina. En Chile no predomina la cría de cabras y se crían en condiciones que difieren del modelo trashumante llevado a cabo en la provincia de Neuquén (Sapag, 2011). El hecho de que el predominio y la cría de cabras es diferente en Chile y Neuquén podría relacionarse con el hecho de que hasta la fecha en Chile solo se ha informado un solo caso de infección humana debido a G6 (Manterola *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta los haplotipos frecuentes de *E. granulosus* sensu stricto entre Chile y Neuquén, sería posible pensar que *E. canadensis* G6 podría expandir su distribución hacia Chile, lo que sugiere que es necesario estudiar la presencia de *E. canadensis* G6 en humanos y animales en Chile.

La red de haplotipos construida con las secuencias descritas en Neuquén y las secuencias de G6 encontradas en Genbank mostró una configuración del tipo estrella, con el haplotipo Ec01 como haplotipo central (Figura 32). Este trabajo de tesis no aborda el análisis sobre la diversidad genética y la estructura de la población de *E. canadensis* en cada continente ni de cómo se dispersó *E. canadensis* G6 en el mundo ya que escapa a los objetivos de este trabajo de tesis, por lo tanto quedan como interrogantes para futuros estudios.

A pesar de que se requieren más estudios filogeográficos en la provincia de Neuquén, los resultados de este trabajo de tesis podrían transferirse a los programas de control de hidatidosis y al sistema de salud para la aplicación de nuevas herramientas que contribuyan al control de esta zoonosis endémica.

El estudio de la diversidad genética de *E. granulosus* sensu lato, analizando la secuencia completa del gen *cox1* en QH humanos, contribuye a la comprensión de las perspectivas históricas sobre la dispersión del parásito. En el caso de este trabajo de tesis,

los resultados proporcionan conocimiento sobre la propagación del parásito en Latinoamérica después de la llegada de los colonos españoles, destacando y confirmando la presencia de los haplotipos de propagación mundial Eg01 y Ec01 como los principales haplotipos presentes en la provincia de Neuquén. Además, el estudio de la microdiversidad en la región patagónica en ambos lados de la cordillera proporciona información sobre el intercambio genético y la transmisión del parásito en esa región. La alta diversidad descrita sugiere que el parásito se introdujo varias veces desde diferentes fuentes a esta provincia. Nuevas investigaciones en la microdiversidad de *E. granulosus* sensu lato en el resto de las provincias de Argentina, España y otros países sudamericanos podrían dilucidar el probable origen del parásito en esta parte del mundo.

La distribución de las poblaciones de *E. granulosus* sensu lato es habitualmente del tipo agregada en el HD, HI y en el hospedador sin salida, y se ajusta a un modelo de distribución binomial negativa: hay pocos hospedadores con muchos parásitos y muchos hospedadores con pocos parásitos (Gemmell *et al.*, 2001). En la infección echinococcósica no hay regulación de las poblaciones debido a la densidad poblacional, ni a la mortalidad del hospedador inducida por el parásito. La intensidad de la infección de los hospedadores condiciona la dinámica de transmisión de *E. granulosus* sensu lato, que depende de factores extrínsecos (clima, suelos, barreras físicas, presencia de agentes que dispersen los huevos), socio-ecológicos (relacionados con el hombre y sus costumbres, las modalidades de explotación ganadera, el nivel de educación) e intrínsecos del parásito (potencial biótico, período prepatente, genotipo) y de los hospedadores (tipo de HI y HD involucrados, presencia de inmunidad adquirida en el HI). Muchos de estos factores son particulares en cada región, por lo que deben evaluarse en cada caso. La caracterización de la dinámica de transmisión implica el estudio de los factores que contribuyen a la regulación y estabilidad de las poblaciones del parásito en sus diferentes estadios, y constituye la base para evaluar la situación epidemiológica local y establecer el control de la echinococcosis (Pierangeli & Debiaggi, 2014).

La dinámica de transmisión de *E. granulosus* sensu lato varía en las distintas regiones del mundo de acuerdo a numerosos factores, entre ellos, la importancia del ganado y/o de los intermediarios silvestres, los genotipos del parásito y al grado de adaptación del parásito a los HI presentes. Así por ejemplo, en Australia intervienen principalmente los ciclos perro/oveja y dingos/marsupiales; en el Reino Unido ovejas y caballos, mientras que en Medio Oriente y norte de África están involucrados los camellos. La diversidad de ganado (ovino, caprino, bovino, porcino) y animales salvajes en Neuquén implica que pueden estar presentes simultáneamente varios HI en un mismo territorio. El conocimiento de los genotipos que infectan cada hospedador y la posibilidad de interacción entre los ciclos biológicos es importante para establecer la dinámica de transmisión en las regiones donde conviven varios HI (Thompson & McManus, 2001). La comprensión de la dinámica de transmisión de los distintos genotipos de *E. granulosus* sensu lato es de suma utilidad para adecuar las medidas de prevención y control. Por ejemplo, recientemente un programa de control piloto en Lituania, basado en la desparasitación de perros en momentos específicos antes del sacrificio de cerdos, ha logrado una fuerte reducción de *E. canadensis* (G7) (Šarkūnas *et al.*, 2019). Sin embargo, en áreas con producción extensiva de ovejas se sabe que se deben aplicar medidas adicionales para controlar *E. granulosus* sensu stricto, por ejemplo, registro y desparasitación regular de perros, educación en salud pública, construcción de zanjas para la eliminación correcta de despojos, vacunación de ovinos con EG95, entre otras (Craig *et al.*, 2017).

En este trabajo de tesis se demostró la existencia simultánea de varios ciclos sinantrópicos de EQ en la provincia de Neuquén (Figura 33). El reservorio para *E. granulosus* sensu stricto G1 es el ganado ovino, para *E. canadensis* G6 el caprino y para *E. canadensis* G7 el porcino. Todas estas especies de *E. granulosus* sensu lato ocurren de manera simpátrica en la provincia de Neuquén. El ciclo del haplotipo de *E. granulosus* sensu stricto G1 original descrito por Bowles *et al.* (1992) en ovinos está presente en los departamentos de Minas y Confluencia. El ciclo es activo en el departamento de Confluencia donde se encontraron todos los ovinos con QH fértiles y es inactivo en Minas donde los ovinos

encontrados presentaban QH infértiles. Debido a que el número de aislamientos de los haplotipos G1nqnB, G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE fue bajo no se pudo definir si existe coincidencia geográfica de los mismos. Sin embargo, los haplotipos G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE de QH provenientes de humanos fueron encontrados en ganado de la provincia de Neuquén estudiados en este trabajo de tesis y en estudios previos. A pesar de que en este estudio no se encontraron ovinos infectados con *E. granulosus* sensu stricto G3, Soriano *et al.* (2010) describieron un ovino infectado con la misma secuencia de G3 en Chos Malal, el mismo departamento donde se encontró un humano infectado con G3 en el presente trabajo de tesis. Sería necesario analizar más QH en Chos Malal para determinar el reservorio de G3 en este departamento. El ciclo de G6 en cabras se mantiene activo en el norte de la provincia (en los departamentos de Minas, Chos Malal y Pehuenches), donde la ganadería trashumante asegura el estrecho contacto entre el hombre, el perro y el ganado. El ciclo de G7 en cerdos está presente y activo en el departamento de Confluencia. Por lo tanto, en este departamento existen simultáneamente dos ciclos activos: el ciclo de G1 en ovinos y el ciclo G7 en cerdos. La casuística humana es importante en el Este y Sur de la provincia, pero es necesario estudiar QH de ganado local para determinar los reservorios de G1 y G6 en esta zona así como también el de G7 en el departamento de Minas. Los resultados del presente trabajo demuestran que el noroeste de la Patagonia Argentina es un escenario complejo para la transmisión de EQ. Esta información resulta de gran utilidad para ser aplicada al diseño de nuevas estrategias en el programa de control de hidatidosis de la provincia de Neuquén, más adaptados a las características biológicas de los genotipos presentes en la provincia, con el fin de optimizar la vigilancia y el control de la enfermedad. La aplicación de medidas más eficientes contribuirá a disminuir la endemidad de la EQ y por ende mejorar la salud de la población. Además, se ha comprobado que la vacuna EG95 que previene la infección en el ganado, es efectiva solamente para prevenir la infección con *E. granulosus* sensu stricto. El gen que codifica la vacuna EG95 está basada en *E. granulosus* sensu stricto G1 y debido a las diferencias antigénicas demostradas de los genotipos no sería efectiva para *E. canadensis* (Alvarez Rojas *et al.*, 2013). Por lo tanto, el uso de la vacuna

EG95 en un programa de control donde ocurren múltiples especies y genotipos, como es el caso de la provincia de Neuquén, necesitaría ser monitoreado a fondo.

En este trabajo de tesis se analizaron los aspectos biológicos de la infección con *E. granulosus* sensu lato en humanos de la provincia de Neuquén. Se obtuvieron datos del paciente como la edad y el sexo (Tabla 15). La EQ se adquiere generalmente a temprana edad pero puede ser detectada a cualquier edad y su prevalencia aumenta con la edad (Djuricic *et al.*, 2010). La distribución de acuerdo a la edad mostró que el agente etiológico estuvo presente en todos los grupos etarios. Los grupos más afectados fueron de 10-18 y de 28-36 años, estos datos son similares a los reportados previamente en Neuquén por Pierangeli *et al.* (2007). El elevado porcentaje de casos en pacientes menores a 18 años indica que existe una transmisión activa de la EQ. Se considera que los niños están más expuestos a infectarse debido a que juegan en el suelo y tienen contacto cercano con los perros. El porcentaje de niños con EQ (30,2%) encontrado en este estudio fue superior al reportado previamente en niños (13,3%) de la provincia de Neuquén por Pierangeli *et al.* (2007) y es similar a reportes de otros países del mundo donde la transmisión del parásito es muy activa. Por ejemplo, en Kazajistán y en Kirguistán, países con elevada endemicidad de EQ, el porcentaje de niños infectados fue 29,0% y 33,0%, respectivamente, respecto del total de los casos (Torgerson, 2013). La proporción de niños con EQ encontrado en este estudio es muy alta para una región que se encuentra bajo un programa de control hace casi 50 años, reforzando la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para reducir el impacto de esta zoonosis en Neuquén. Los grupos etarios menos afectados correspondieron a los grupos de 55-63 y 73-81 años. Esto podría deberse a tres razones principales: en primer lugar, la población de estos grupos de edad representa solo el 8,6% de la población total de Neuquén (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020); en segundo lugar, como la infección se adquiere con mayor frecuencia durante la infancia, el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en los grupos de edad avanzada podría haberse hecho antes del 2012 y por lo tanto, se obtuvieron pocos QH de esos grupos etarios en este estudio; y en tercer lugar, es posible que en los grupos etarios mayores, los pacientes

tuvieran QH calcificados, que no se operan y por lo tanto no fueron incluidos en este estudio.

La distribución de los casos de acuerdo al sexo mostró mayor número de hombres infectados que mujeres, sin embargo no se observaron diferencias significativas (Tabla 15). En una revisión sistemática realizada por Budke *et al.* (2013) se encontró que la prevalencia de EQ tiende a ser mayor en mujeres y sugerían que esto podía ser causado por los roles de género en las regiones endémicas, lo que hace que las mujeres cuiden con mayor frecuencia las necesidades diarias de los perros, cuiden los jardines y preparen la comida. El mayor número de casos en hombres en la provincia de Neuquén podría relacionarse al modelo trashumante para la crianza de las cabras en las zonas rurales que es llevado a cabo fundamentalmente por el hombre. El análisis de la distribución de acuerdo al sexo y a la edad mostró, con una diferencia significativa, que había más casos pediátricos en niños que en niñas, fundamentalmente en el rango de edad de 10 a 18 años. Esta diferencia podría ser explicada debido a que los niños suelen acompañar a los padres en los procesos de traslado entre las zonas de veranada e internada.

La mayoría de los estudios de genotipificación en humanos generalmente no brindan información sobre la edad y sexo de los pacientes. En uno de los pocos estudios que brinda esta información se analizaron 43 casos de pacientes con hidatidosis de Mongolia y no detectaron casos de menores de 18 años infectados con G1, sin embargo describieron pacientes adultos infectados con G1 y menores de 18 años y adultos infectados con G6 (Ito *et al.*, 2014). Esto difiere de los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observó con diferencias significativas mayor cantidad de pacientes menores de 18 años infectados con el genotipo G1 (Tabla 16). No se detectaron casos de mujeres menores de 18 años infectadas con G6, esto refuerza la teoría explicada anteriormente de que los varones menores de 18 años suelen acompañar a los padres en el proceso de trashumancia para la crianza de cabras, HI que actúa como reservorio de *E. canadensis* G6.

El análisis de la localización anatómica de los QH mostró que un solo órgano estaba afectado en 95,1% de los casos. Este resultado coincide con el 95,8% descrito previamente

en 938 pacientes de Neuquén en el período 1995-2004 (Pierangeli *et al.*, 2007). La localización anatómica más frecuente en humanos fue el hígado, seguido por los pulmones (Tabla 17). Este resultado coincide con lo descrito por otros autores en distintas partes del mundo (Wen *et al.*, 2019). La relación hígado/pulmón en este estudio fue 1,3:1; este valor es mucho menor a lo reportado por otros autores en estudios basados en casos quirúrgicos y/o sintomáticos. Una revisión de la literatura de 9.970 pacientes (originarios de regiones de América del Sur, África, Europa, Australia y Asia) reveló que la relación hígado/pulmón fue 2,5:1 (Larrieu & Frider, 2001), valor similar al reportado por Dopchiz *et al.* (2007) en Mar del Plata. Existen diferentes hipótesis sobre la localización anatómica final de los QH. El hígado es el órgano más frecuentemente infectado porque las oncosferas penetran en la pared intestinal y llegan al hígado a través de la vena porta. Si la oncosfera no se asienta en el hígado, ésta puede viajar a través del torrente sanguíneo o por los vasos linfáticos y llegar al lado derecho del corazón, luego a la circulación menor, donde pueden asentarse en el pulmón, enclavándose en las anastomosis arteriovenosas precapilares de las distribuciones peribronquiales y subpleurales. Si la oncosfera escapa del filtro pulmonar, ingresa a la circulación sistémica pudiendo llegar a los lugares más variados, especialmente a los órganos de mayor vascularización, entre ellos bazo, riñón, entre otros (Ramos *et al.*, 2001).

Si las oncosferas pasan a través de los primeros filtros, que son el hígado y los pulmones, o pasan por alto estos órganos usando el sistema linfático, pueden causar diseminación hematogena y linfática del parásito. Por lo tanto, el QH puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo humano (Gun *et al.*, 2017). En este trabajo de tesis, el 16,3% de los QH se encontraban en órganos inusuales. Este valor es superior al reportado por Pierangeli *et al.* (2007) en un estudio retrospectivo de denuncias de casos en la provincia de Neuquén, donde describieron que el 2,6% de los QH presentaban localizaciones inusuales. Estas diferencias pueden ser debidas a que en este estudio se trabajó con casos quirúrgicos, mientras que Pierangeli *et al.* (2007) realizaron un estudio retrospectivo basado en denuncias de casos con EQ. Los QH en localizaciones anatómicas poco frecuentes podrían dar más sintomatología y por lo tanto son extraídos mediante cirugía. Además, cabe

aclarar que este trabajo de tesis se realizó casi 10 años después y durante este tiempo mejoró la tecnología en el diagnóstico por imágenes que podrían contribuir a la detección de QH en localizaciones anatómicas inusuales.

La localización anatómica inusual más frecuente encontrada en este trabajo de tesis fue la localización ósea vertebral. De acuerdo a la literatura, la EQ en huesos ocurre sólo en 0,5%-2,5% de los pacientes y afecta la columna vertebral en la mitad de los casos. La afectación primaria del hueso ocurre debido al asentamiento de la oncosfera transportada por los vasos sanguíneos en el hueso (Loudiye *et al.*, 2003; Papanikolaou, 2008).

Las localizaciones anatómicas inusuales son descriptas generalmente como informes de casos. Las localizaciones anatómicas inusuales poco frecuentes descriptas en este trabajo de tesis fueron páncreas, riñón, fémur, cerebro, peritoneo, bazo y localización extrapleural, encontrando un solo caso de cada localización. En la literatura, la incidencia de hidatidosis pancreática es inferior al 2,0%, incluso en áreas endémicas (Ozsay *et al.*, 2018). Dentro del 0,5-2,5% de los pacientes que presentan EQ ósea, el 16,0% presenta quistes en el fémur, valor superior al encontrado en este trabajo de tesis (Ramteke *et al.*, 2019).

La variación en las frecuencias de localización anatómica de QH observada en diversos estudios en todo el mundo podría deberse a la infección con diferentes genotipos de *E. granulosus* sensu lato, lo que podría tener una afinidad por diferentes órganos (Kern *et al.*, 2017). Actualmente, la mayor parte de los estudios de genotipificación de QH humanos no informan la localización anatómica de los quistes. En este trabajo de tesis se realizó, por primera vez en la provincia de Neuquén, el análisis de la distribución de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en relación a la localización de los QH humanos de Neuquén (Tabla 18). Se observó que la mayor parte de los QH hepáticos correspondían a *E. granulosus* sensu stricto G1 y el 23,7% correspondían a *E. canadensis* G6. Los cuatro QH producidos por *E. granulosus* sensu stricto G3 y el único quiste G7 presentaban localización hepática. En un estudio bibliográfico realizado por Cucher *et al.* (2016) se determinó que el hígado es el órgano principalmente afectado por *E. granulosus*

sensu stricto G1, seguido por *E. canadensis* G6 y G7, en concordancia con lo descrito en este trabajo de tesis.

Cuando se analizaron las localizaciones anatómicas más frecuentes para *E. granulosus* sensu stricto G1 se observaron diferencias significativas entre la localización hepática y pulmonar, sugiriendo que este genotipo tendría una mayor afinidad por el hígado. El 60,4% de los quistes pulmonares correspondían a *E. canadensis* G6, presentando diferencias significativas con el genotipo *E. granulosus* sensu stricto G1. Aunque se observó que la mayoría de los quistes del genotipo G6 se encontraban en los pulmones, este genotipo también infectó otros órganos como el hígado, los riñones, vértebras, el cerebro, entre otros. La ubicación de los quistes de *E. canadensis* G6 en humanos parece coincidir con la observada en las cabras de Neuquén y en estudios previos que sugirieron un tropismo de *E. canadensis* G6 por el pulmón (Bardonnnet *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2010). Este resultado se contradice con lo descrito por Sadjjadi *et al.* (2013) En el presente trabajo de tesis el único QH de localización cerebral perteneció al genotipo G6, coincidiendo con lo descrito por Sadjjadi *et al.* (2013). Sin embargo, el resultado de este trabajo de tesis no es suficiente para confirmar la hipótesis de Sadjjadi *et al.* (2013), quienes sugirieron que el genotipo G6 parece tener una mayor afinidad por el cerebro humano. Además, se observó con diferencias significativas que los QH del genotipo G6 se encontraban mayormente en localizaciones extrahepáticas. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sugieren que *E. canadensis* G6 podría tener más facilidad para evitar los primeros filtros naturales, ya que suele aparecer en pulmones y localizaciones poco frecuentes.

Cabe destacar que no se pudo establecer una correlación entre la localización anatómica de los QH y los distintos haplotipos *cox1* de *E. granulosus* sensu lato descritos en este trabajo, debido que el número de aislamientos por haplotipo era bajo. Sería interesante analizar más secuencias completas del gen *cox1* de *E. granulosus* sensu lato en humanos para ver si existe relación haplotipo/localización como la observada en ganado.

La mayoría de las infecciones primarias en humanos consisten en un único QH, sin embargo, entre el 20,0% y 40,0% de los individuos presentan múltiples quistes o múltiples

órganos afectados (Moro *et al.*, 2009). Esto coincide con los resultados descriptos en este trabajo de tesis, donde el 23,8% de los pacientes presentaba más de un quiste. El único paciente que tenía una coinfección con G1 y G7 presentaba tres QH en el hígado. Se observó, con diferencias significativas, que el 37,5% de los pacientes infectados con el genotipo G1 presentaban más de un QH (con un máximo de 6 QH en un paciente), mientras que el 12,0% de los pacientes infectados con el genotipo G6 presentaron hasta 2 QH (Figura 34). Estos resultados sugieren que el genotipo G1 estaría más adaptado que G6 a la infección en humanos.

El análisis de la fertilidad de los QH humanos de Neuquén mostró que el 61,7% de los quistes eran fértiles, y el 48,5% de los quistes fértiles eran viables. En la provincia de Neuquén no se aplica un protocolo único de tratamiento antihelmíntico de la EQ, ya que el tratamiento va a depender de la presentación clínica y las características del QH en relación a: estado evolutivo, tamaño y localización. El tratamiento farmacológico administrado antes de la cirugía puede esterilizar los QH, reduciendo o eliminando el riesgo que plantea el derrame del contenido del quiste durante la cirugía (Belaïd *et al.*, 2001). A pesar de que el 51,2% de los pacientes analizados en este trabajo recibió tratamiento antihelmíntico, la fertilidad de los QH fue alta: el 64,3% de los quistes eran fértiles y el 40,7% de los QH fértiles eran viables. Los estudios sobre fertilidad y viabilidad de QH en humanos son escasos. El porcentaje de viabilidad obtenido en este trabajo de tesis es menor que el descripto por Manterola *et al.* (2005) en Chile, en donde pacientes con QH hepáticos tratados durante cuatro días con ABZ antes de la cirugía, el tratamiento fue ineficaz ya que el 61,8% de los QH eran viables. En Argelia y Túnez se han descripto QH humanos con porcentajes de fertilidad superiores (88,4% y 93,3% respectivamente) a los descriptos en el presente trabajo de tesis; mientras que el porcentaje de viabilidad fue menor en Túnez (21,8%) y mayor en Argelia (74,5%) (Lahmar *et al.*, 2009; Zait *et al.*, 2014). Sólo el estudio realizado en Túnez mencionó que de los 41 pacientes estudiados 4 recibieron tratamiento quirúrgico. Los porcentajes de fertilidad y viabilidad altos de los QH aumentan el riesgo de

hidatidosis secundaria, que es una de las complicaciones más graves de la hidatidosis después de la ruptura, fisura de los QH o maniobras realizadas durante el acto quirúrgico.

Cuando se analizó la fertilidad y viabilidad de los quistes de acuerdo a la localización se observó que las localizaciones más frecuentes tenían el mismo porcentaje de fertilidad, sin embargo los QH hepáticos fértiles presentaban una mayor viabilidad con respecto a los pulmonares (Tabla 19). Estos resultados difieren con respecto a lo descrito en Argelia por Zait *et al.* (2014), donde tanto la fertilidad como la viabilidad fueron similares en hígado y pulmón. Los únicos quistes de localización cerebral, pancreática y ósea (fémur) encontrados en este trabajo de tesis fueron infértiles.

Los QH de localización hepática y pulmonar, tanto de *E. granulosus* sensu stricto G1 y G3 como por *E. canadensis* G6, presentaron porcentajes altos de fertilidad (Tabla 20). Lahmar *et al.* (2009) describieron una fertilidad de 93,3% en quistes hepáticos G1 de humanos de Túnez; este valor es superior a lo descrito en este trabajo de tesis (71,7%). Sin embargo, debe considerarse que solo el 9,75% (4/41) de los pacientes de Túnez habían recibido tratamiento, lo cual podría afectar la fertilidad. Los genotipos G1, G3 y G6 parecerían estar bien adaptados al desarrollo de QH en humanos, debido a que producen QH fértiles, a pesar de que los humanos sólo se consideran “hospedadores sin salida”. Los pacientes infectados con los genotipos G1, G3 y G6 presentaron QH con elevada fertilidad, por lo tanto tienen un riesgo particularmente alto de echinococcosis secundaria.

Actualmente, en la provincia de Neuquén sólo existe un protocolo para el tratamiento de QH hepáticos, sin tener en cuenta otras localizaciones anatómicas de los QH (Ministerio de Salud Provincia de Neuquén, 2012). Por este motivo el tratamiento de QH extrahepáticos es aleatorio y los tratamientos se realizan teniendo en cuenta la situación particular del paciente. Además, muchos pacientes llegan a los hospitales con complicaciones y son operados inmediatamente sin realizar un tratamiento previo a la operación. Todas estas consideraciones dificultan el análisis de la efectividad del tratamiento en los pacientes con hidatidosis. Sin embargo, en este trabajo de tesis se observó que en pacientes con tratamiento antihelmíntico por más de 20 días antes de la

cirugía con una dosis de ABZ de entre 10 mg/kg/día no se encontraron quistes viables. Esto podría ser tenido en cuenta en las revisiones de las guías clínicas de tratamiento de la hidatidosis, ya que permitiría la realización de cirugías más seguras, disminuyendo el riesgo de infección secundaria (Tabla 21).

Teniendo en cuenta que se consideran pequeños aquellos QH con un diámetro menor a 5,0 cm, el tamaño promedio de los QH analizados en este trabajo fue mediano independientemente del genotipo y la localización. El promedio y rango de los QH obtenidos en este estudio coinciden con los obtenidos por Fica *et al.* (2012), quienes analizaron pacientes de Santiago de Chile y obtuvieron un tamaño promedio de quistes únicos de 7,7 cm y un rango de 3,0-20,0 cm. Este tamaño promedio mediano de los QH puede deberse al hecho de que los pacientes consultaron por los síntomas de la enfermedad en los centros de salud de manera tardía. El tamaño promedio de los QH hepáticos y pulmonares analizados en este estudio fue similar (Tabla 22). Sin embargo, existe evidencia de que los quistes hepáticos crecen de manera más lenta que los quistes pulmonares. El tejido pulmonar es elástico y ofrece escasa resistencia al crecimiento del parásito dando lugar al crecimiento del quiste, incluso hasta ocupar todo el hemitórax, causando síntomas severos en menor tiempo que los QH hepáticos (Aribas *et al.*, 2002). En cambio, el tejido hepático es relativamente denso y ofrece mayor resistencia, por lo tanto los QH hepáticos crecen más lentamente y pueden permanecer pequeños y asintomáticos durante años (Larrieu & Frider, 2001; Kern *et al.*, 2017). El tamaño similar de QH hepáticos y pulmonares obtenido en este trabajo de tesis podría ser debido a que en general ambos tipos de QH fueron operados cuando los QH tenían un tamaño mayor a 5,0 cm provocando síntomas en el paciente.

La velocidad de crecimiento de los QH depende del curso natural de la infección por el parásito y está condicionado por el órgano, tipo de tejido afectado y el genotipo del QH. Se ha descrito que las características genotípicas de *E. granulosus* sensu lato pueden conducir a una variabilidad importante de la enfermedad, en particular con respecto a la velocidad de crecimiento del QH (Siracusano *et al.*, 2012b). Sin embargo, existen pocos

estudios donde se evalúe el tamaño del quiste en relación con el genotipo. Soriano (2011) evaluó la velocidad de crecimiento de QH pulmonares G6 en cabras y determinó que el diámetro promedio fue de 3,98 cm y la velocidad de crecimiento fue 0,71 cm/año, resultado similar a lo descrito por Guarnera *et al.* (2004). Pierangeli (2013) demostró en ganado que los QH de *E. canadensis* G6 crecían más rápido que los QH de *E. granulosus* sensu stricto G1. Guarnera *et al.* (2004) describieron que el diámetro promedio de los quistes hepáticos y pulmonares G1 en humanos fue de 10 cm y 12 cm, respectivamente, mientras que para los quistes hepáticos y pulmonares G6 fue de 18 cm y 5,7 cm, respectivamente. A excepción del diámetro de los QH pulmonares G6, el resto de los diámetros promedios fueron superiores a los descritos en este trabajo de tesis (Tabla 23). Esta diferencia puede ser debida a que el número de muestras analizadas en ese estudio fue menor al de este trabajo de tesis.

El papel de *E. canadensis* G7 como agente causante de la EQ en humanos generalmente se subestima. Schneider *et al.* (2010) sugirieron que las razones de esta subestimación podrían ser que los quistes G7 tienden a ser pequeños, localizados en el hígado y pueden ser asintomáticos durante años o probablemente nunca detectados. El resultado de este trabajo de tesis parece estar de acuerdo con esa sugerencia, ya que la única detección de quiste de *E. canadensis* G7 se localizó en el hígado, y el diámetro del quiste era 0,5 cm.

Hasta el momento no se han realizado estudios donde se evalúe el crecimiento de QH de acuerdo a la localización y genotipo de los quistes y a la edad del paciente. En este trabajo de tesis se evaluó el crecimiento de los QH hepáticos y pulmonares de acuerdo al genotipo, se analizó la variación del diámetro mayor de todos los QH hepáticos y pulmonares de genotipo G1 y G6, en función del grupo etario de los pacientes (Figuras 36 y 37). Se demostró que el diámetro mayor aumentó en forma lineal para las localizaciones hepática y pulmonar de genotipo G1. El diámetro mayor de los QH G6, tanto para la localización hepática como pulmonar, presentó una correlación lineal moderada. Sería necesario realizar más estudios para determinar si este resultado de grandes variaciones en

el diámetro es debido a la infección por *E. canadensis* G6 o algún otro factor, como la respuesta inmune del hospedador. Muchos estudios inmunológicos han demostrado que el desarrollo de QH resulta del equilibrio entre la respuesta inmunológica del huésped (respuestas humorales y celulares) y las diversas estrategias desarrolladas por los parásitos para defenderse contra los ataques inmunes del huésped (Siracusano *et al.*, 2012a).

El análisis de los QH hepáticos de acuerdo a la clasificación de OMS brinda información sobre el riesgo clínico relacionado con la evolución del parásito. Cabe recordar que en este trabajo de tesis no se incluyeron pacientes con QH CE5, ya que a estos pacientes no se les realiza tratamiento quirúrgico sino que se observa la evolución del QH en el tiempo (watch and wait) (Ministerio de Salud Provincia de Neuquén, 2012). Los QH activos CE1 y CE2 constituyeron el 42,6% de todos los casos (Tabla 24). El 35,2% de los QH se clasificaron como transicionales, que a pesar de que se consideran QH que están comenzando a degenerarse, se ha demostrado que generalmente son viables (Hosch *et al.*, 2008). Esta información sugiere la importancia del diagnóstico precoz de EQ debido al hecho de que la mayoría de los QH se encuentran en estadios viables.

Cuando se evaluó la relación entre el genotipo y el estadio según OMS de los QH hepáticos se observó, con diferencias significativas, que la mayoría de los QH de *E. granulosus* sensu stricto G1 eran activos y transicionales mientras que la mayoría de los QH de *E. canadensis* G6 eran inactivos (Tabla 25). Esto podría deberse a que existe una mayor adaptación por parte de *E. granulosus* sensu stricto G1 a la infección en humanos. Además, como se describió anteriormente en este trabajo de tesis, existe una asociación significativa entre *E. canadensis* G6 y la localización pulmonar, por lo tanto se sugiere que aquellos QH producidos por *E. canadensis* G6 tenderían a estar inactivos cuando se localizan en el hígado. Sin embargo, estos resultados se contradicen con lo descrito por Guarnera *et al.* (2004), quienes encontraron en 36 pacientes mayor cantidad de QH activos y transicionales tanto para los QH G1 como para los QH G6. Por lo tanto, sería importante realizar más estudios donde se relacione el genotipo y el estadio según OMS de los QH hepáticos y así determinar si existe alguna relación entre estas variables.

Con el objetivo de determinar el patrón de evolución de los QH, se estableció el crecimiento anual de quistes en los genotipos identificados en Neuquén. Este análisis se llevó a cabo suponiendo que la infección ocurrió a los 3 años, cuando los niños gatean, juegan en el suelo y están más en contacto con los perros (Pawlowski, 1997; Guarnera *et al.*, 2004). Considerando la fecha estimada de infección y la edad promedio en años de personas con quistes de cada tipo (Tabla 26), el tiempo promedio de infección debe ser de 15 años para CE1, 3 para CE2, 18 para CE3 y 6 para CE4. La suma de los tiempos de infección para los diferentes estadios según OMS sugiere que el quiste podría terminar su desarrollo en CE4 o CE5 después de 42 o más años de evolución. Estos resultados difieren con lo descrito por Guarnera *et al.* (2004) quienes realizaron el mismo análisis en QH de genotipo G1, G2, G5 y G6 de Argentina, pero el tiempo promedio de infección era de 19 años para CE1, 13 para CE2, 10 para CE3 y 19 para CE4. Estas diferencias pueden ser debidas al número de muestras analizadas o bien al genotipo de los quistes analizados, ya que en este trabajo de tesis se analizaron los estadios de QH G1, G3 y G6. Sería importante realizar estudios con mayor cantidad de muestras para cada estadio y genotipo y de esta manera poder determinar de manera más precisa el patrón de evolución de los QH.

Típicamente, los QH no producen síntomas clínicos hasta que hayan alcanzado un tamaño particular. Pawlowski (1997) consideró que quistes de más de 5,0 cm dan síntomas en adultos, sin embargo en niños los síntomas pueden aparecer antes de que el QH alcance los 5,0 cm. La diversidad de manifestaciones clínicas, asociadas a la ruptura de un quiste, está relacionada con la localización anatómica del QH, su tamaño y liberación de material antigénico responsable de las reacciones de hipersensibilidad sistémica (Kern *et al.*, 2017). La mayor parte de los pacientes presentaba sintomatología, incluso aquellos pacientes con QH menores o iguales a 5,0 cm que debieron ser operados porque presentaban complicaciones. Paradójicamente, la mayoría de los pacientes pediátricos, tanto sintomáticos como asintomáticos, presentaron QH mayores a 5,0 cm. Sólo tres pacientes pediátricos sintomáticos presentaron QH menores a 5,0 cm. El dolor abdominal fue el síntoma más comúnmente reportado para EQ hepática y la tos fue el síntoma más

comúnmente reportado para EQ pulmonar (Tabla 27). Estos resultados coinciden con lo descrito en la revisión de la literatura sobre EQ a nivel mundial por Budke *et al.* (2013).

En general, las manifestaciones clínicas asociadas con los quistes hepáticos son diversas, y los pacientes presentan dolor abdominal, dispepsia, fiebre o manifestaciones alérgicas, incluida erupción cutánea. Sin embargo, el único paciente con cuatro QH hepáticos G3 presentó síntomas no abdominales, como tos y dolor torácico. Esto puede ser debido a que los QH podrían haberse localizado en la parte superior del hígado y el gran tamaño de los QH, fundamentalmente de uno de los quistes de aproximadamente 20 cm, podrían haber realizado presión sobre la parte baja de los pulmones generando los síntomas mencionados anteriormente. Otra posibilidad, menos probable, sería que los síntomas fueron dados por el genotipo G3 del QH. No obstante, el análisis de pacientes con EQ realizado en este trabajo de tesis sugiere que no existe relación entre la sintomatología y los genotipos de *E. granulosus* sensu lato encontrados en pacientes de Neuquén. Este resultado coincide con los hallazgos en pacientes de Argentina obtenidos por Guarnera *et al.* (2004).

5.3. ESTUDIO 3: Aspectos inmunológicos de la infección por *Echinococcus granulosus* sensu lato en humanos

El diagnóstico de la EQ se basa principalmente en la epidemiología y en los estudios por imágenes. Sin embargo, las imágenes no detectan en muchos casos los estadios tempranos de la enfermedad. La serología es útil como complemento del diagnóstico por imágenes, especialmente en pacientes asintomáticos, en el seguimiento post tratamiento y en catastros poblacionales para la detección de casos asintomáticos (Carmena *et al.*, 2007). No obstante, el desempeño de las herramientas serodiagnósticas actuales basadas en la detección de anticuerpos contra antígenos de *E. granulosus* sensu lato está lejos de ser óptima, debido a que presentan resultados dispares con especificidad, sensibilidad y estandarización de las pruebas poco satisfactorias (Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

Para el diagnóstico inmunológico de la EQ humana en la provincia de Neuquén hasta el año 2000 se utilizaron HAI y Doble Difusión Arco 5 con resultados poco satisfactorios, por lo cual, en la actualidad el inmunodiagnóstico no está incluido en las normas provinciales de diagnóstico de la hidatidosis humana (Ministerio de Salud Provincia de Neuquén, 2012). En los últimos 20 años ha habido mejoras significativas en el diagnóstico serológico de echinococosis, sin embargo no se han realizado estudios en pacientes de Neuquén. Por este motivo, en este trabajo de tesis se evaluó por primera vez en la provincia de Neuquén la sensibilidad de tres tests serológicos comerciales: HAI, ELISA IgG y TIR.

En este estudio TIR fue la prueba serológica que presentó mayor sensibilidad, seguida de ELISA IgG, sin diferencias significativas entre ellas. Tanto TIR como ELISA IgG resultaron mejores que HAI, con diferencias estadísticamente significativas, la cual presentó la sensibilidad más baja. Estos resultados coinciden con la literatura, donde se reporta una mejor sensibilidad general para las pruebas de lectura indirecta basadas en los antígenos 5 y B de *E. granulosus* sensu lato (Tamarozzi *et al.*, 2016). La prueba de HAI es una técnica inmunológica de lectura directa que utiliza LH para la detección de anticuerpos específicos de EQ y presenta una serie de inconvenientes, que incluyen baja sensibilidad y un pobre

valor pronóstico para el seguimiento debido a la persistencia duradera de los anticuerpos contra el LH (Manzano-Román *et al.*, 2015).

Para la evaluación de la respuesta inmune en relación a distintas variables, se analizaron los resultados de los tests de ELISA IgG y/o TIR realizados a los sueros de los pacientes, ya que fueron los test serológicos que presentaron mejor sensibilidad y no presentaron diferencias significativas entre ellos. La sensibilidad de ELISA IgG y/o TIR fue diferente a la sensibilidad obtenida en otros estudios, siendo en algunos casos mayor y en otros menor a la sensibilidad obtenida en este estudio (Tamer *et al.*, 2015; Tamarozzi *et al.*, 2016, 2017; Ertuğ *et al.*, 2018; Vola *et al.*, 2018; Zait & Hamrioui, 2019). Los diferentes desempeños en estas pruebas serológicas pueden ser explicados por distintas variables relacionadas a la técnica (tipo de prueba, calidad y pureza del antígeno, adecuadas concentraciones de los reactivos utilizados), variables biológicas del QH (localización anatómica, tamaño, estadio, cantidad) y variabilidades individuales de los pacientes en la respuesta inmune. (Siles-Lucas *et al.*, 2017a; Hernández-González *et al.*, 2018). La mayor parte de los estudios analizan el rendimiento de las pruebas serológicas teniendo en cuenta variables como la localización anatómica y en el caso de los quistes hepáticos el estadio según OMS. En este estudio se evaluó por primera vez en América la respuesta inmune de los pacientes en función de un conjunto de variables que incluye: genotipo, localización, estadio según OMS, tamaño del QH, número de QH por pacientes y grupo etario.

Entre las expresiones fenotípicas de las diferencias genotípicas de *E. granulosus* sensu lato descritas hasta el momento se incluye una importante variabilidad antigénica, lo cual podría impactar en la respuesta inmune que genera en el hospedador y, por ende, afectar los resultados de las pruebas serológicas (Siles-Lucas *et al.*, 2017a; Hernández-González *et al.*, 2018). Ito *et al.* (2014) evaluaron la sensibilidad de un test de ELISA de acuerdo al genotipo de quistes hepáticos de 43 pacientes, que utiliza el antígeno recombinante B8/1 (rAgB) producido a partir de *E. multilocularis* (rEmAgB), y determinaron que el 90,0% de los pacientes con QH hepáticos de *E. granulosus* sensu stricto G1 y el 65,0%

de los pacientes con QH de *E. canadensis* G6/G7 fueron positivos. En este trabajo de tesis, se analizó el porcentaje de positividad de los tests ELISA IgG y/o TIR en función del genotipo del QH en varias localizaciones anatómicas y se observó un porcentaje similar tanto para los pacientes con QH de *E. granulosus* sensu stricto G1 como para los pacientes con QH de *E. canadensis* G6 (Tabla 28). El porcentaje de positividad de la serología de los pacientes infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1 analizados en este trabajo de tesis presentaron una sensibilidad similar a los resultados obtenidos por Ito *et al.* (2014), sin embargo para los pacientes infectados con *E. canadensis* G6 de Neuquén el porcentaje de positividad fue mayor que los del estudio mencionado. Estas diferencias pueden ser explicadas por el origen de la fuente antigénica utilizada en los tests serológicos. Los antígenos del LH y sus fracciones nativas purificadas son heterogéneos y contienen mayor cantidad de epítopes que los antígenos recombinantes, por lo cual estos últimos suelen ser más específicos aunque presentan menor sensibilidad (Lorenzo *et al.*, 2005; Siles-Lucas *et al.*, 2017a; Hernández-González *et al.*, 2018). Es posible que el antígeno recombinante utilizado por Ito *et al.* (2014) no haya podido detectar los anticuerpos de los pacientes infectado con G6, mientras que sí lo pudieron detectar los antígenos del LH presentes en los tests serológicos utilizados en este trabajo de tesis.

La localización anatómica del quiste podría influir en la respuesta inmune del hospedador ya que el estímulo antigénico podría diferir según el órgano de implantación. El análisis del porcentaje de positividad de los test serológicos en función de la localización anatómica mostró que el 81,4% de los pacientes con QH hepáticos y el 85,4% de los pacientes con QH pulmonares fueron positivos para EQ (Tabla 29). Un hecho que se muestra claramente desde las aplicaciones iniciales de la serología al diagnóstico de hidatidosis es que los quistes pulmonares generalmente producen solo una leve respuesta serológica debido a la mala calidad del antígeno pulmonar. Otras localizaciones anatómicas, como la hepática, suelen presentar una mejor respuesta serológica (Zarzosa *et al.*, 1999; Zait & Hamrioui, 2019). Sin embargo, en este trabajo de tesis no se observaron diferencias

significativas entre el porcentaje de positividad de los pacientes con QH de localización hepática y pulmonar.

Cabe destacar que, si bien fueron pocos casos, el porcentaje de positividad de los tests serológicos fue del 100,0% en pacientes que presentaban localizaciones anatómicas poco frecuentes, como QH óseos, extrapleurales y retroperitoneales. En zonas rurales de la provincia de Neuquén, donde la EQ es más frecuente y los sistemas de salud son básicos y/o de difícil acceso, la disponibilidad de TIR sería muy útil para ayudar en el diagnóstico diferencial durante los catastros ecográficos y para la detección de EQ en pacientes con QH en localizaciones anatómicas poco frecuentes.

El análisis del porcentaje de positividad del test serológico de acuerdo al estadio de los QH hepáticos mostró diferencias significativas entre los QH activos e inactivos (Tabla 30). En concordancia con otros estudios, el porcentaje de positividad de la serología analizada en este trabajo de tesis fue estadísticamente significativo bajo en el diagnóstico de QH inactivos CE4 (Tamarozzi *et al.*, 2016, 2017; Hernández-González *et al.*, 2018; Vola *et al.*, 2018). Estos resultados confirman las limitaciones de la serología en el diagnóstico de la EQ y en la utilidad del diagnóstico diferencial de quistes CE4 y CE5 de otras lesiones hepáticas. Existen pruebas de que los pacientes con EQ tienen perfiles serológicos comunes y específicos de cada estadio (Mariconti *et al.*, 2014; Ahn *et al.*, 2015). Ahn *et al.* (2015) demostraron que el antígeno 5 parece ser inmunoreactivo en todos los estadios, a diferencia del antígeno B, cuyas proteoformas revelaron una captura de anticuerpos reducida en las etapas CE1, CE4 y CE5.

El porcentaje de positividad de los tests serológicos para el diagnóstico de la EQ también depende del tamaño del QH. En este estudio se observó que el porcentaje de positividad de la serología de pacientes con QH de tamaño grande era bajo y presentaba diferencias significativas con aquellos pacientes con QH de tamaño mediano (Tabla 31). Sin embargo, este análisis incluyó pacientes con QH de distintas localizaciones anatómicas, de tal manera que el resultado de la serología puede estar influenciado tanto por el tamaño

como por la localización anatómica del QH. Al analizar el porcentaje de positividad de la serología solo de aquellos pacientes con QH hepáticos se observó que el porcentaje de positividad era del 50,0% para los QH con tamaño pequeño y presentaba diferencias significativas con los QH de tamaño mediano (Tabla 32). Desde el punto de vista biológico, el aumento de la masa antigénica expuesta al sistema inmunitario del hospedador debido a la pérdida de integridad de la pared del quiste (ya sea espontáneamente o como resultado de la terapia) y el aumento de la masa antigénica cuando hay QH grandes podrían explicar la mayor respuesta inmunológica del paciente (Lissandrin *et al.*, 2016).

Otra variable que puede afectar el desempeño de las pruebas serológicas es el número de QH por paciente, ya que la concentración de anticuerpos aumenta cuando hay múltiples QH (Lissandrin *et al.*, 2016) (Tabla 34). En concordancia con otros estudios, el porcentaje de positividad de la serología en pacientes con más de cuatro QH fue mayor que en aquellos pacientes con menos de tres quistes (Zait *et al.*, 2019). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de positividad de la serología de aquellos pacientes que presentaban 1, 2 o más de 3 QH. Sería necesario realizar más estudios que evalúen el porcentaje de positividad de los test serológicos fundamentalmente en pacientes que presenten más de tres QH.

En conclusión, en este trabajo de tesis se demostró que tanto la prueba de ELISA IgG como TIR funcionan bien en la detección de anticuerpos contra *E. granulosus* sensu lato en muestras de suero humano. Sin embargo, TIR tiene algunas ventajas respecto a ELISA IgG, como su resolución en poco tiempo, no se requiere de personal especializado, es fácil de interpretar los resultados, generalmente es más económico y no requieren refrigeración para ser transportados o almacenados (Siles-Lucas *et al.*, 2017a). Sería importante evaluar en el futuro la especificidad y la reactividad cruzada en presencia de otras infecciones helmínticas presentes en la provincia y la inclusión de muestras de pacientes con afecciones no parasitarias que podrían intervenir con el rendimiento de las pruebas serológicas. En base a los resultados obtenidos se sugiere el uso de esta prueba de diagnóstico rápido para

apoyar el diagnóstico clínico en combinación con la ecografía y para fines de detección en regiones donde la EQ es endémica, como el norte de la provincia de Neuquén.

En el presente trabajo de tesis se analizó el perfil proteico de los LH provenientes de caprinos, ovinos, bovinos, porcinos de Neuquén con el objeto de evaluar las posibles diferencias entre HI y genotipos. Además, se evaluó por primera vez en Argentina el perfil proteico del LH de origen humano. Teniendo en cuenta que el LH se utiliza como fuente antigénica en el diagnóstico serológico de EQ, las variaciones en su composición podrían influir en la sensibilidad y especificidad, y en consecuencia, en el resultado de las pruebas serológicas.

Se ha demostrado que los genotipos del parásito *E. granulosus* sensu lato difieren entre sí en uno o más aspectos, ya sea morfológicos, biológicos, o en características del ciclo biológico (Thompson, 2017). Éstas diferencias pueden influir en la antigenicidad, la velocidad de desarrollo, la patogenicidad y la sensibilidad del parásito a las drogas antihelmínticas (Thompson & McManus, 2001; 2002). Actualmente, se reconoce que esta variabilidad tiene consecuencias importantes en el desarrollo de reactivos para diagnóstico, vacunas y drogas antihelmínticas que impactan en la epidemiología y control de la EQ (Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

Las proteínas de excreción-secreción y aquellas expresadas en la superficie de las capas del QH intervienen en las estrategias para que el parásito pueda desarrollarse en el microambiente del hospedador y para defenderse de los ataques del sistema inmune. Estas proteínas están en estrecho contacto con el hospedador, por lo que son de elección para ser utilizadas como fuente de antígenos en el desarrollo de pruebas de diagnóstico, y como blanco de vacunas y nuevas drogas antihelmínticas (Rosenzvit *et al.*, 2006; Kesik *et al.*, 2019).

En el presente trabajo, la variación de las proteínas de *E. granulosus* sensu lato presentes en el LH se determinó mediante la separación electroforética en geles de SDS-PAGE, y se evaluó su relación con el HI u hospedador sin salida y con características del QH (genotipo, localización anatómica y fertilidad). Se observaron diferencias en la cantidad y

en el PM de las bandas entre los LH provenientes de distintos HI y humanos, genotipos, localizaciones y fertilidad de los QH (Tabla 36).

Las diferencias en el perfil proteico entre LH de un mismo genotipo y fertilidad, pero obtenido de diferentes hospedadores, como por ejemplo, entre QH pulmonares fértiles de *E. canadensis* G6 de caprinos y de humanos, podrían explicarse por la presencia de distintas proteínas del hospedador en el LH. En el caso de los LH de ovinos, caprinos y humanos G1, todos procedieron de QH fértiles, por lo que la presencia de proteínas de excreción-secreción de los PSC en el LH podría ser responsable de las diferencias observadas con los LH obtenidos de QH G1 infértiles de bovinos.

El fraccionamiento de las proteínas del LH por SDS-PAGE ha sido poco estudiado y las evaluaciones fueron realizadas fundamentalmente en ovinos y, en menor medida, en bovinos, búfalos, caballos, caprinos y camellos. En casi todos los casos, el análisis se realizó teniendo en cuenta el HI involucrado, pero sin la determinación del genotipo del QH por métodos moleculares, ni la localización y fertilidad de los QH (Gottstein *et al.*, 1987; Kanwar *et al.*, 1992; Shambesh *et al.*, 1995; Ioppolo *et al.*, 1996; Burgu *et al.*, 2000; Irabuena *et al.*, 2000; Carmena *et al.*, 2004; Maity *et al.*, 2007; Taherkhani *et al.*, 2007; Khosravi *et al.*, 2012). En este trabajo de tesis se evaluó por primera vez en el mundo el perfil proteico de LH de origen humano teniendo en cuenta la localización, fertilidad y genotipo del QH.

Pierangeli (2013) realizó un estudio comparativo del perfil proteico de LH obtenidos de caprinos, ovinos, bovinos y porcinos de la provincia de Neuquén y mostró diferencias en las bandas según el HI, especificando el genotipo del QH. Se encontraron algunas diferencias entre el trabajo reportado por Pierangeli (2013) y este trabajo de tesis. Los LH de origen ovino analizados en este trabajo de tesis, correspondían a *E. granulosus* sensu stricto G1 de localización hepática y mostraron sólo 10 bandas, entre 8 y 199 kDa, siendo la principal la correspondiente a 65 kDa (Figura 38). Este resultado difiere del estudio realizado por Pierangeli (2013) quien describió 18 bandas en QH fértiles y 10 bandas en QH infértiles. Además, identificó 12 bandas principales con pesos moleculares de 8, 16, 21-25, 30, 37, 43, 55, 67, 72, 86, 137 y 159 kDa en el análisis de SDS-PAGE, coincidiendo sólo la banda de 67

kDa con la banda principal encontrada en este trabajo de tesis. Esta misma banda principal fue encontrada en un estudio donde se analizó LH de ovejas de Turquía infectadas con *E. granulosus* sensu stricto G1, sin embargo no brindan información acerca de la fertilidad del QH (Kesik *et al.*, 2019).

Algunas de las principales bandas observadas en el presente trabajo en el LH de caprinos G6 fértiles, correspondientes a 11 y 58, concuerdan con los hallazgos en QH de caprinos G6 fértiles de Neuquén (Pierangeli, 2013).

En el perfil proteico del LH de origen porcino de genotipo G7 fértil se observaron 21 bandas en un rango de 8 a 312 kDa. Los PM de las principales fracciones fueron de 8, 11, 24, 53, 63, 84, 96, 106, 151 y 198 kDa, siendo las bandas de 8, 24 y 54 coincidentes con las bandas principales encontradas previamente en cerdos con QH G7 fértiles de Neuquén (Pierangeli, 2013).

En los LH de origen bovino genotipo G1 infértiles se observaron sólo 10 bandas con una sola banda principal de 63 kDa. Esta banda coincide con una de las principales fracciones descritas previamente en bovinos con QH G1 infértiles de Neuquén (Pierangeli, 2013).

Las diferencias en el perfil proteico entre LH de un mismo HI, fertilidad y genotipo podría ser debido a que los QH podrían pertenecer a distintos haplotipos. Por lo tanto, sería necesario realizar más estudios para determinar el haplotipo de estos QH mediante la secuenciación completa del gen *cox1* y así establecer si las diferencias son debidas a la variabilidad genética del parásito.

El perfil proteico del LH de humanos de genotipo G1 fértiles presentó 22 bandas tanto para los QH de localización hepática como pulmonar. Además, estos perfiles proteicos coincidían en algunas bandas principales como las bandas de 8, 54 y 64 kDa. Al analizar el perfil proteico del LH de humanos de genotipo G6 fértiles se observó menor cantidad de bandas que los LH de genotipo G1, con 15 bandas los QH de localización pulmonar y 14 bandas los QH hepáticos. Esta diferencia en la cantidad de bandas podría ser explicada porque los QH pertenecen a distintas especies/genotipos de *E. granulosus* sensu lato. La

variabilidad de estas especies/genotipo se observaría en las principales proteínas antigénicas del parásito, incluyendo los antígenos Ag5 y AgB, así como otras proteínas inmunomoduladoras, incluyendo enzimas proteolíticas y antioxidantes que se encuentran en el LH (Siles-Lucas *et al.*, 2017b). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis no se pudieron comparar con otros estudios porque no existe hasta el momento otras publicaciones sobre el perfil proteico de LH de origen humano según la localización, fertilidad y genotipo del QH.

La caracterización antigénica de *E. granulosus* sensu lato es fundamental para la comprensión de los aspectos inmunológicos de la EQ (D'Amelio *et al.*, 1985). Los primeros trabajos sobre los antígenos de los distintos estadios del parásito describían la presencia de al menos 10 proteínas antigénicas en el LH, y hacían especial hincapié en dos de ellas, los antígenos 4 (ahora AgB) y 5, para ser aplicados al diagnóstico inmunológico de EQ (Musiani *et al.*, 1978). El diagnóstico de EQ está basado fundamentalmente en estudios por imágenes, pero éstos no detectan los estadios tempranos de la enfermedad (Kern *et al.*, 2017). La aplicación del diagnóstico inmunológico en humanos, especialmente en la fase asintomática de la hidatidosis, podría brindar a los pacientes la oportunidad del tratamiento farmacológico temprano y mejorar el seguimiento clínico. Las pruebas serológicas pueden aplicarse a gran escala, aún en comunidades alejadas de centros de complejidad. Actualmente, el LH es la principal fuente antigénica utilizada en las pruebas serológicas para el diagnóstico de hidatidosis humana, con valores de sensibilidad adecuados, pero su especificidad está afectada por la reactividad cruzada con un amplio número de otras enfermedades parasitarias y no parasitarias (Zhang & McManus, 2006; Siles-Lucas *et al.*, 2017a).

La caracterización de los antígenos de *E. granulosus* sensu lato presentes en el LH ha sido estudiada fundamentalmente en ovinos, y solo algunos trabajos se realizaron en QH de bovinos, camellos, caballos, humanos, caprinos o porcinos. Sin embargo, en esos estudios la evaluación de la composición antigénica fue realizada teniendo en cuenta el HI y, en algunos trabajos, la localización de los QH, pero sin considerar el genotipo

determinado por técnicas de biología molecular (Pozzuoli *et al.*, 1975; Gottstein *et al.*, 1987; Shambesh *et al.*, 1995; Irabuena *et al.*, 2000; Mamuti *et al.*, 2002; Rafiei & Craig, 2002; Carmena *et al.*, 2004, 2005; De la Rue *et al.*, 2010; Khosravi *et al.*, 2012; Hadipour *et al.*, 2016). Sólo dos estudios analizaron la composición antigénica teniendo en cuenta el HI, la localización y genotipo de los QH (Pierangeli, 2013; Kesik *et al.*, 2019).

La detección de anticuerpos específicos en suero de pacientes es la técnica de elección para el inmunodiagnóstico de la EQ. La detección de anticuerpos se realiza generalmente aplicando la técnica ELISA (Zhang *et al.*, 2012). Otra técnica que se emplea en los laboratorios de diagnóstico es el IB, aunque generalmente como técnica confirmatoria (Delunardo *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, tanto el ELISA como el IB contienen antígenos nativos, generalmente el LH completo o algunas fracciones semipurificadas del mismo enriquecidas en Ag5 o en AgB.

El LH es la principal fuente antigénica en las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en pacientes afectados por EQ y debe recolectarse de quistes en animales o pacientes infectados naturalmente. En este sentido, la composición del LH depende en gran medida de su origen, principalmente debido a la variabilidad entre los fenotipos del parásito que infectan a diferentes hospedadores y entre las diferentes etapas de desarrollo del QH (Aziz *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2015). La caracterización antigénica del LH de distintos orígenes podría aportar conocimientos acerca de la relación hospedador–parásito, que podrían aplicarse al diagnóstico inmunológico de EQ.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas se comenzaron a evaluar antígenos purificados del LH, péptidos sintéticos y proteínas recombinantes. Algunos antígenos recombinantes han demostrado un mejor rendimiento que el LH para diferenciar la EQ de otras patologías por serología y para el seguimiento de pacientes en tratamiento, incluidas varias isoformas del AgB (por ejemplo el AgB1, B2, B3 y B4) y el Ag5, entre otros (Siles-Lucas *et al.*, 2017a; Hernández-González *et al.*, 2018). Tanto el AgB como el Ag5 se expresan en todos los estadios del ciclo de vida del parásito. Las isoformas del AgB, codificadas por una familia multigénica que tiene al menos cinco

subunidades de loci genéticos, se expresan de forma variable en los distintos genotipos de *E. granulosus* sensu lato, en los distintos estadios del ciclo de vida y estadios del quiste; por lo tanto, la expresión variable de las isoformas del AgB puede afectar el rendimiento de las pruebas diagnósticas (Monteiro *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2015).

En la interpretación de los resultados de las pruebas inmunodiagnósticas debe considerarse también que la respuesta humoral y celular en humanos con hidatidosis varía entre individuos. Esta variabilidad podría atribuirse a la diversidad en los genes humanos del complejo mayor de histocompatibilidad que participan en la presentación antigénica y a los diferentes genotipos del parásito, lo que podría influir también en la evolución de la enfermedad (Dreweck *et al.*, 1997).

En el presente trabajo se evaluó la composición antigénica del LH proveniente de HI (caprinos, ovinos, porcinos y bovinos) que participan en ciclos simultáneos de *E. granulosus* sensu lato en la provincia de Neuquén. Además, se analizó por primera vez la composición antigénica de LH proveniente de humanos con EQ de la provincia de Neuquén. Los factores, como la localización, fertilidad y genotipo del QH, que podrían afectar a los antígenos presentes en cada HI fueron considerados. Hasta el momento, todos los estudios sobre caracterización antigénica obtuvieron el perfil antigénico mediante IB enfrentando las bandas de proteínas del LH con pools de sueros humanos con hidatidosis confirmada (Carmena *et al.*, 2005; Pierangeli, 2013; Hadipour *et al.*, 2016). Sin embargo, *E. granulosus* sensu lato comprende varios genotipos que potencialmente expresan diferentes conjuntos antigénicos y por lo tanto podrían generar respuestas inmunológicas variables. Esto puede conducir a un rendimiento diagnóstico diferente de un LH específico (Manzano-Román *et al.*, 2015).

En este trabajo de tesis se evaluó, por primera vez en el mundo, la composición antigénica del LH proveniente de QH de distintos HI y humanos enfrentando las bandas de proteínas del LH con sueros de pacientes con hidatidosis confirmada, teniendo en cuenta el genotipo del QH con el cual estaban infectados estos pacientes. Para el grupo control, los

LH se enfrentaron a sueros de pacientes sanos. Estos sueros no reconocieron ninguna banda al enfrentarlos a los distintos LH de los distintos hospedadores analizados, en coincidencia con lo descrito por otros autores (Pierangeli, 2013; Hadipour *et al.*, 2016). Los sueros de humanos infectados con los genotipos G1, G3, G6 o G1-G7 reconocieron antígenos en los LH de todos los hospedadores analizados, aunque con diferencias considerables entre sí y según el origen y genotipo del LH (Figura 39).

La evaluación de la respuesta inmune mediante IB mostró que el suero de pacientes infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1 reconoció mayor cantidad de antígenos en los LH proveniente de humanos que presentaban QH de *E. granulosus* sensu stricto G1, tanto de localización hepática como pulmonar, respecto al resto de los LH (Tabla 37). Esto puede ser explicado porque tanto el LH como el suero son G1 y, por lo tanto, el LH expresa los mismos antígenos que los anticuerpos del suero G1. En ambas localizaciones se observaron las bandas asociadas al AgB (8/10, 16, 20-24 kDa). Las bandas correspondientes a multímeros de AgB, fueron reconocidas por el suero de pacientes infectados con G1 en todos los LH, excepto en los bovinos, pero con diferente patrón e intensidad. Este resultado podría ser debido a que los LH de bovinos fueron los únicos que provenían de QH infértiles. La ausencia de la banda de 45-47 kDa en el patrón antigénico del LH de porcinos G7, que está presente en el resto de los LH, podría relacionarse a diferencias relacionadas con el HI o el genotipo.

Además de las bandas correspondientes al AgB y al Ag5 presentes en los distintos LH, otras proteínas antigénicas de *E. granulosus* sensu lato fueron detectadas al enfrentar el suero G1 con los distintos LH del presente trabajo. Las bandas de 12–14 kDa podrían relacionarse con la presencia de los antígenos EgTeg y HSP-70 debido a la similitud de PM (Ortona *et al.*, 2003, 2005). Estas bandas fueron detectadas en LH provenientes de QH de ovinos G1, caprinos G6, humanos G1 (tanto de localización hepática como pulmonar) y en humanos con QH hepáticos G6. La proteína EgTeg se encuentra en el tegumento de los PSC, la capa germinal y el LH, y se la relaciona con la supervivencia del parásito. EgTeg es una molécula inmunomoduladora, debido a que inhibe la quimiotaxis e induce a los linfocitos

productores de IL-4, favoreciendo una respuesta inmune Th2 asociada con la infección crónica (Ortona *et al.*, 2005). La proteína HSP-70 posee funciones inmunomoduladoras, ya que es una molécula antigénica que induce las respuesta de linfocitos B y T (Ortona *et al.*, 2003).

El suero del paciente infectado con *E. granulosus* sensu stricto G3 reconoció menor cantidad de bandas en los distintos LH que el suero G1, a pesar de que ambos genotipos corresponden a la misma especie (Tabla 38). A diferencia de lo que se observó en el IB con suero G1, mayor cantidad de bandas se observaron al enfrentar suero G3 con LH proveniente de QH humanos G6 (hepática y pulmonar) que con LH proveniente de humanos G1, fundamentalmente en aquellos que presentaban QH con localización pulmonar. Todos los perfiles antigénicos de los LH analizados en este trabajo presentaron las bandas correspondientes a AgB pero con diferente patrón e intensidad, excepto en el LH proveniente de QH pulmonares de humanos infectados con *E. granulosus* sensu stricto G1. Este resultado puede estar afectado por distintas variables: 1) los quistes pulmonares dan antígenos de baja calidad; 2) baja concentración proteica; 3) estadio del QH (Akisu *et al.*, 2006; Siles-Lucas *et al.*, 2017a). Las bandas correspondientes al Ag5 (22, 36, 57 y 67 kDa) fueron reconocidas con diferentes patrones en los LH obtenidos de QH de ovinos G1, caprinos G6, porcinos G7 y en humanos con QH de localización pulmonar, tanto de genotipo G1 como G6. Sería necesario realizar este estudio con mayor cantidad de sueros de pacientes infectados con G3, debido a que en este trabajo se realizó con el suero de un único paciente y por lo tanto no se pudo llegar a una conclusión.

Tanto los LH de origen caprino con QH G6 hepático como de origen humano con QH G6 pulmonar fueron los LH con mayor número de bandas al enfrentar los LH con el suero de pacientes infectados con *E. canadensis* G6 (Tabla 39). Sin embargo, el número de bandas fue menor respecto al IB con sueros de otros genotipos. Esto puede ser debido a que un porcentaje de pacientes no presentan anticuerpos frente a los antígenos del LH (Barnes *et al.*, 2012). Los LH provenientes de QH de ovinos, caprinos, porcinos, humanos G1 (pulmonar

y hepáticos) y humanos G6 pulmonar analizados en este trabajo presentaron las bandas correspondientes al AgB pero con diferente patrón e intensidad. Mientras que las bandas correspondientes al Ag5 se reconocieron sólo en los LH provenientes de QH de ovinos, caprinos y humanos G1 de localización hepática. La diferente expresión de antígenos no es solamente debido al genotipo parasitario, sino que también depende del estadio del QH. En un estudio de proteómica e inmunoproteómica se ha demostrado que los estadios quísticos CE1 y CE2 difieren en la expresión de los antígenos inmunodominantes (AgB y Ag5). El Ag5 es predominantemente reconocido por anticuerpos de pacientes con etapas iniciales, mientras que el AgB es más escaso en el estadio CE1 y es principalmente detectado en pacientes con estadios CE2 y CE3 (Chen *et al.*, 2014). En este trabajo de tesis solo se obtuvo información del estadio de algunos QH de humanos, por lo tanto sería interesante realizar estudios donde se incluya el estadio del QH para evaluar la expresión antigénica.

Contrariamente a lo esperado, la menor cantidad de bandas en los distintos LH se observó al enfrentar el suero del paciente con coinfección con *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G7. Este suero debería contener los anticuerpos tanto para los antígenos producidos por los QH G1 como por los QH G7. Sin embargo, al enfrentar el suero con los distintos LH se observaron muy pocas bandas. La banda de 163 kDa encontrada en el LH proveniente de ovinos G1 corresponde muy probablemente a la subunidad de 160 kDa del AgB. De manera similar el polipéptido de 14 kDa podría corresponder a la subunidad de 16-18 kDa del AgB o a los antígenos EgTeg y HSP-70. Los únicos LH que reconocieron bandas correspondientes al Ag5 fueron los LH provenientes de humanos con QH G1 pulmonar, con una banda de 57 kDa, y el LH de origen porcino con QH G7 hepático, con bandas de 57 y 67 kDa. En el resto de los LH se detectaron algunas bandas pero no correspondían a ninguno de los antígenos más estudiados hasta el momento (Wen *et al.*, 2019). La baja cantidad de bandas detectadas puede ser debido a la influencia de distintas variables además del genotipo, como por ejemplo el estadio del QH. Hasta el momento, no hay bibliografía sobre IB en pacientes con coinfecciones.

En este trabajo de tesis se obtuvo mayor cantidad de sueros de pacientes infectados con el genotipo *E. granulosus* sensu stricto G1 y *E. canadensis* G6, por lo tanto, se realizó la comparación de la respuesta inmune mediante IB enfrentando el suero de los pacientes a diferentes perfiles antigénicos de LH. Se observó que los pacientes infectados con el genotipo G1 tenían una mejor respuesta inmune que aquellos pacientes infectados con el genotipo G6. Incluso la respuesta inmune de los pacientes infectados con G1 fue mayor al enfrentar el suero con LH G6 de distinto origen que los pacientes infectados con G6. Esto puede ser debido a que los QH G6 generarían menor cantidad de anticuerpos en el paciente que los QH G1. Sin embargo, serían necesario realizar más estudios para confirmar esta conclusión.

Resumiendo, en el presente trabajo de tesis se describió por primera vez la composición antigénica del LH de distintos HI y humanos teniendo en cuenta no solamente las posibles diferencias por el HI, la fertilidad, localización y genotipo del QH, sino teniendo en cuenta el genotipo del suero utilizado en el IB. Además, se describió la diferencia en la respuesta inmune de los pacientes infectados con los genotipos más frecuentes, G1 y G6.

La caracterización del perfil antigénico de los LH de caprinos, porcinos, ovinos, bovinos y humanos de Neuquén mostró que existen diferencias entre todos ellos, atribuibles a las diferencias de HI, de genotipo y de fertilidad del QH y al genotipo del suero del paciente. La presencia del AgB en la mayoría de los LH provenientes de los distintos HI y humanos estudiados indica que podría ser utilizado para el inmunodiagnóstico de EQ en humanos. Sin embargo, el método deberá validarse frente a un amplio panel de sueros para establecer la sensibilidad, especificidad y las posibles reacciones cruzadas. Este panel de sueros debería incluir: 1) pacientes con hidatidosis confirmada, genotipo del QH y datos clínicos relevantes; 2) pacientes con otras parasitosis (especialmente teniasis, cisticercosis y echinococcosis alveolar); 3) pacientes con patología crónicas del hígado y otros órganos; 4) pacientes sanos para grupo control.

Se ha demostrado en el presente trabajo de tesis que existen ciclos simultáneos y activos de varias especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en la provincia de

Neuquén, todas infectivas para el hombre. En consecuencia, el genotipo y perfil antigénico de la fuente de antígenos deberían considerarse especialmente en la realización de las pruebas diagnósticas, con el objeto de diagnosticar adecuadamente pacientes infectados con diferentes especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en Neuquén.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

El trabajo de tesis permitió llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las especies y genotipos *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1 (haplotipo original y los haplotipos G1nqnB y G1nqnD), *E. canadensis* genotipo G6 y *E. canadensis* genotipo G7 (haplotipo original y el haplotipo G7nqn01) están presentes en QH de distintos HI de la provincia de Neuquén.
2. El ganado porcino puede infectarse con *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1 en la provincia de Neuquén.
3. Existe asociación estadísticamente significativamente entre el genotipo del quiste y el tipo de HI en el ganado de Neuquén: *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1 se encontró principalmente en ovinos y bovinos, *E. canadensis* genotipo G6 en caprinos y *E. canadensis* genotipo G7 en porcinos.
4. Existen importantes diferencias fenotípicas de acuerdo al genotipo entre los quistes de caprinos, ovinos, porcinos y bovinos de Neuquén, principalmente en la preferencia por el HI, la localización anatómica del QH, la fertilidad y la viabilidad.
5. La asociación estadísticamente significativa entre la localización y el genotipo del quiste demostró que existe tropismo de G6 en caprinos por la localización pulmonar y de G7 en porcinos por la hepática.
6. Existe una relación haplotipo-localización anatómica en el ganado ovino: G1 original-localización hepática; G1nqnB localización pulmonar.
7. Los QH provenientes de los cuatro HI estudiados presentan diferencias en la fertilidad: los QH de porcinos presentaron mayor fertilidad, seguido por los QH de caprinos y ovinos; la mayor parte de los quistes de bovinos fueron infértiles.
8. Cuando se considera la secuencia de 366 pb del gen mitocondrial que codifica para *cox1* se evidencia que las siguientes especies y genotipos están presentes en QH humanos de Neuquén: *E. granulosus* sensu stricto genotipo G1 con cuatro haplotipos (el genotipo original y tres haplotipos: G1nqnC, G1nqnD y G1nqnE), *E. granulosus* sensu stricto genotipo G3, *E. canadensis* genotipo G6 y *E. canadensis* genotipo G7.

9. Se describió por primera vez en Argentina la infección en humanos con *E. granulosus* sensu stricto genotipo G3.
10. Se describió por primera vez en Argentina y en las Américas la infección en humanos con *E. canadensis* G7.
11. Se describió por segunda vez en el mundo y por primera vez en las Américas una coinfección con dos especies diferentes de *E. granulosus* sensu lato en humanos: *E. granulosus* sensu stricto G1nqnD y *E. canadensis* G7.
12. El porcentaje de infecciones con *E. canadensis* G6 en humanos de Neuquén triplica al porcentaje descrito para la distribución mundial, por lo tanto G1 y G6 tienen importancia epidemiológica en la provincia.
13. La distribución espacial de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en humanos de Neuquén es heterogénea, especialmente en el norte de la provincia.
14. Existe diversidad de haplotipos *cox1* de *E. granulosus* sensu stricto y de *E. canadensis* en humanos de Neuquén. Se describieron por primera vez tres nuevos haplotipos *cox1* de *E. granulosus* sensu stricto y cinco nuevos haplotipos *cox1* de *E. canadensis* cuando se analizaron las secuencias de 1609 pb.
15. Existen ciclos simultáneos y activos de varias especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en la provincia de Neuquén, todas infectivas para el hombre, siendo el ganado ovino reservorio del haplotipo de *E. granulosus* sensu stricto G1 original, el ganado caprino reservorio de *E. canadensis* G6 y el ganado porcino reservorio de *E. canadensis* G7.
16. La provincia de Neuquén presenta un elevado porcentaje de casos en niños menores a 18 años, lo que indica que existe una transmisión activa de la EQ.
17. Existen importantes diferencias fenotípicas (biológicas y clínicas) de acuerdo al genotipo en los quistes humanos de Neuquén, principalmente en la localización anatómica del QH, la fertilidad, número de QH y estadio según OMS en los quistes hepáticos.
18. La localización anatómica más frecuente en humanos de Neuquén es el hígado, seguido por los pulmones. La relación hígado/pulmón en pacientes de la provincia de Neuquén es menor respecto a otros reportes en el mundo.

19. En humanos existe asociación estadísticamente significativa entre *E. granulosus* sensu stricto G1 y localización hepática y *E. canadensis* G6 y localización pulmonar. Los QH del genotipo G6 presentan mayormente localizaciones anatómicas extrahepáticas.
20. Los genotipos G3 y G6 estarían bien adaptados al desarrollo de QH en humanos debido a que producen QH fértiles, al igual que el genotipo G1.
21. El tratamiento antihelmíntico pre-quirúrgico de los pacientes, por más de 20 días, con una dosis de ABZ de entre 10 mg/kg/día, logró disminuir la viabilidad de los quistes al 0%.
22. Existen diferencias significativas entre el genotipo y el estadio según OMS de los QH en humanos de Neuquén: los QH de *E. granulosus* sensu stricto G1 son mayormente activos y los QH de *E. canadensis* G6 son mayormente inactivos.
23. Las pruebas serológicas ELISA IgG y TIR presentan, con diferencias significativas, mayor sensibilidad que HAI para la detección de anticuerpos contra *E. granulosus* sensu lato en muestras de suero humano.
24. La respuesta inmune de anticuerpos de los pacientes se ve afectada por el tamaño y la cantidad de QH por paciente, y en el caso de los QH hepáticos por el estadio según OMS (activo e inactivo); mientras que el genotipo, la localización anatómica del QH y la edad del paciente no afectan la respuesta inmune.
25. Los perfiles proteicos de los LH provenientes de distintos HI y humanos, genotipos, localizaciones y fertilidad de los QH presentan diferencias en la cantidad y en el PM de las bandas.
26. Existen diferencias en la composición antigénica del LH de distintos HI y humanos al enfrentar las bandas de proteínas del LH con sueros de pacientes con hidatidosis confirmada, teniendo en cuenta el genotipo con el cual estaban infectados estos pacientes. Las variaciones en la composición antigénica son atribuibles a las diferencias de HI, de genotipo y de fertilidad del QH y al genotipo del suero del paciente.
27. El AgB, que actúa como un inmunomodulador del parásito, está presente en la mayoría de los LH analizados pero con diferencias en la cantidad de bandas antigénicas, lo que sugiere que podría ser utilizado para el inmunodiagnóstico de EQ en humanos.

28. Existen diferencias en la respuesta inmune de los pacientes infectados con los genotipos G1 y G6 cuando se evalúa mediante IB frente a diferentes perfiles antigénicos de LH.

Los resultados obtenidos en los tres estudios de este trabajo de tesis permiten concluir que existe importante variabilidad genética y de expresión fenotípica entre las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato en los distintos HI y humanos presentes en la provincia de Neuquén. Además, se demostró la existencia simultánea de distintos ciclos sinantrópicos de EQ que involucran humanos y distintos HI en la provincia de Neuquén. Los conocimientos generados permiten una mejor comprensión de la transmisión de la EQ, la biología del parásito, los genotipos presentes en los distintos HI y humanos y su distribución geográfica, los aspectos clínicos e inmunológicos de la infección. Los conocimientos generados en esta tesis resultan de gran utilidad para ser aplicados al diseño de nuevas estrategias en el programa de control de hidatidosis de Neuquén, más adaptados a las características biológicas de las especies y genotipos de *E. granulosus* sensu lato presentes en la provincia, con el fin de optimizar el control y la vigilancia de la enfermedad en la provincia. Además, estos conocimientos podrían servir para revisar las indicaciones actuales sobre el diagnóstico y manejo de los pacientes con EQ en la provincia. La aplicación de medidas más eficientes contribuirá a disminuir la endemidad de la EQ y por lo tanto mejorar la salud de la población. La profundización y ampliación de estos conocimientos en futuros estudios permitirá avanzar en el conocimiento integral de esta zoonosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel Aaty, H. E., Abdel-Hameed, D. M., Alam-Eldin, Y. H., El-Shennawy, S. F., Aminou, H. A., Makled, S. S. & Darweesh, S. K. (2012). Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* in animal and human isolates from Egypt. *Acta Trop.*, *121*, 125-128.
- Aboelhadid, S. M., El-Dakhly, K. M., Yanai, T., Fukushi, H. & Hassanin, K. M. (2013). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in Egyptian donkeys. *Vet. Parasitol.*, *193*, 292-296.
- Addy, F., Alakonya, A., Wamae, N., Magambo, J., Mbae, C., Mulinge, E., Zeyhle, E., Wassermann, M., Kern, P. & Romig, T. (2012). Prevalence and diversity of cystic echinococcosis in livestock in Maasailand, Kenya. *Parasitol. Res.*, *111*, 2289-2294.
- Addy, F., Wassermann, M., Kagendo, D., Ebi, D., Zeyhle, E., Elmahdi, I. E., Umhang, G., Casulli, A., Harandi, M. F., Aschenborn, O., Kern, P., Mackenstedt, U. & Romig, T. (2017). Genetic differentiation of the G6/7 cluster of *Echinococcus canadensis* based on mitochondrial marker genes. *Int. J. Parasitol.*, *47*, 923-931.
- Ahn, C. S., Han, X., Bae, Y. A., Ma, X., Kim, J. T., Cai, H., Yang, H. J., Kang, I., Wang, H. & Kong, Y. (2015). Alteration of immunoproteome profile of *Echinococcus granulosus* hydatid fluid with progression of cystic echinococcosis. *Parasit. Vectors*, *8*, 10.
- Akisu, C., Delibas, S. B., Bicmen, C., Ozkoc, S., Aksoy, U. & Turgay, N. (2006). Comparative evaluation of western blotting in hepatic and pulmonary cystic echinococcosis. *Parasite*, *13*, 321-326.
- Al Kitani, F. A., Al Riyami, S., Al Yahyai, S., Al Awahi, A. H., Al Aawali, M. & Hussain, M. H. (2015). Abattoir based surveillance of cystic echinococcosis (CE) in the Sultanate of Oman during 2010-2013. *Vet. Parasitol.*, *211*, 208-215.
- Ali, V., Martinez, E., Duran, P., Seláez, M. A., Barragan, M., Nogales, P., Peña y Lillo, A., Castañares, M., Claros, Y., Deplzes, P. & Alvarez Rojas, C. A. (2020). *Echinococcus granulosus sensu stricto*, *Echinococcus ortleppi*; and *E. intermedius* (G7) are present in Bolivia. *Parasitology*, 1-8.
- Alvarez Rojas, C. A., Ebi, D., Gauci, C. G., Scheerlinck, J. P., Wassermann, M., Jenkins, D. J., Lightowers, W. & Romig, T. (2016). Microdiversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Australia. *Parasitology*, *143*, 1026–1033.
- Alvarez Rojas, C. A., Ebi, D., Paredes, R., Acosta-Jamett, G., Urriola, N., Roa, J. C., Manterola, C., Cortes, S., Romig, T., Scheerlinck, J. P. & Lightowers, M. W. (2017). High intraspecific variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Chile. *Parasitol. Int.*, *66*, 112-115.
- Alvarez Rojas, C. A., Gauci, C. G. & Lightowers, M.W. (2013). Antigenic differences between the EG95-related proteins from *Echinococcus granulosus* G1 and G6 genotypes: implications for vaccination. *Parasite Immunol.*, *35*, 99–102.
- Alvarez Rojas, C. A., Romig, T. & Lightowers, M. W. (2014). *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans: review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.*, *44*, 9-18.
- Amer, S., Helal, I. B., Kamau, E., Feng, Y. & Xiao, L. (2015). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* from farm animals in Egypt. *PLoS One*, *10*, e0118509.

- Andresiuk, M. V., Ponce Gordo, F., Cuesta Bandera, C., Elissondo, M. C., Dopchiz, M. & Denegri, G. (2009). *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain. *Rev. Arg. Microbiol.*, *41*, 218-225.
- Andresiuk, M. V., Ponce Gordo, F., Saarma, M., Elissondo, M. C., Taraborelli, A., Casalongue, C., Denegri, G. & Saarma, U. (2013). *Echinococcus granulosus* genotype G1 dominated in cattle and sheep during 2003-2006 in Buenos Aires province, an endemic area for cystic echinococcosis in Argentina. *Acta Trop.*, *127*, 136-142.
- Aribas, O. K., Kanat, F., Gormus, N. & Turk, E. (2002). Pleural complications of hydatid disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, *123*, 492-497.
- Auer, H., Stöckl, C., Suhendra, S. & Schneider, R. (2009). Sensitivity and specificity of new commercial tests for the detection of specific *Echinococcus* antibodies. *Wien Klin. Wochenschr*, *121*, 37-41.
- Ávila, H. G., Santos, G. B., Cucher, M. A., Macchiaroli, N., Pérez, M.G., Baldi, G., Jensen, O., Pérez, V., López, R., Negro, P., Scialfa, E., Zaha, A., Ferreira, H. B., Rosenzvit, M. & Kamenetzky, L. (2017) Implementation of new tools in molecular epidemiology studies of *Echinococcus granulosus* sensu lato in South America. *Parasitol. Int.*, *66*, 250-257.
- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D. P. & Mulvenna, J. (2011). Proteomic characterization of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics*, *74*, 1560-1572.
- Azlaf, R. & Dakkak, A. (2006). Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. *Vet. Parasitol.*, *137*, 83-93.
- Avise, J. C. (2008). Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.*, *36*, 3-15.
- Balbinotti, H., Santos, G. B., Badaraco, J., Arend, A. C., Graichen, D. A., Haag, K.L. & Zaha, A. (2012). *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, *188*, 255-260.
- Bardonnet, K., Piarroux, R., Dia, L., Schneegans, F., Beurdeley, A., Godot, V. & Vuitton, D. A. (2002). Combined eco-epidemiological and molecular biology approaches to assess *Echinococcus granulosus* transmission to humans in Mauritania: occurrence of the “camel” strain and human cystic echinococcosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *96*, 383-386.
- Barnes, T. S., Deplazes, P., Gottstein, B., Jenkins, D. J., Mathis, A., Siles-Lucas, M., Torgerson, P. R., Ziaidinov, I. & Heath, D. D. (2012). Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. *Acta Trop.*, *123*, 1-7.
- Beato, S., Parreira, R., Calado, M. & Gracio, M. A. (2010). Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitol. Int.*, *59*, 638-642.
- Beato, S., Parreira, R., Roque, C., Gonçalves, M., Silva, L., Maurelli, M. P., Cringoli, G. & Grácio, M. A. (2013). *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet. Parasitol.*, *198*, 235-239.

- Belaïd, S., Ben Safta, Z., Kacem, M., Jouini, M., Ksantini, R., Chebbi, F. & Fteriche, F. (2001). Le traitement laparoscopique du kyste hydatique du foie. Principes et résultats préliminaires. A propos des 40 premiers cas. *European J. Coelio-surgery*, 39, 44-48.
- Bendini, M., Tsakoumagkos, P. & Nogues, C. (2004). Los crianceros trashumantes del Neuquén. En: M. Bendini, C. E. Alemany (Eds.), *Crianceros y chacareros en la Patagonia: Cuadernos GESA 5*. (pp. 23-39). Buenos Aires: Editorial La colmena.
- Bingham, G. M., Budke, C. M., Larrieu, E., Del Carpio, M., Mujica, G., Slater, M. R. & Moguillansky, S. (2014). A community-based study to examine the epidemiology of human cystic echinococcosis in Rio Negro Province, Argentina. *Acta Trop.*, 136, 81-88.
- Bobic, B., Nikolic, A., Radivojevic, S. K., Klun, I. & Djurkovic-Djakovic, O. (2012). Echinococcosis in Serbia: an issue for the 21st century? *Foodborne Pathog. Dis.*, 9, 967-973.
- Boubaker, G., Gottstein, B., Hemphill, A., Babba, H. & Spiliotis, M. (2014). *Echinococcus* P29 antigen: molecular characterization and implication on post-surgery follow-up of CE patients infected with different species of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS One*, 9, e98357.
- Boufana, B., Lahmar, S., Rebai, W., Ben Safta, Z., Jebabli, L., Ammar, A., Kachti, M., Aouadi, S. & Craig, P. S. (2014). Genetic variability and haplotypes of *Echinococcus* isolates from Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 108, 706-714.
- Boufana, B., Lett, W. S., Lahmar, S., Buishi, I., Bodell, A. J., Varcasia, A., Casulli, A., Beeching, N. J., Campbell, F., Terlizzo, M., McManus, D. P. & Craig, P. S. (2015b). *Echinococcus equinus* and *Echinococcus granulosus* sensu stricto from the United Kingdom: genetic diversity and haplotypic variation. *Int. J. Parasitol.*, 45, 161-166.
- Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54, 165-174.
- Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. (1994). Molecular genetic characterization of the cervid strain ("northern form") of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 109, 215-221.
- Bowles, J. & McManus, D. P. (1993) Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57, 231-241.
- Bradford, 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.
- Brehm, K. & Koziol, U. (2017). *Echinococcus*-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv. Parasitol.*, 95, 147-212.
- Breyer, I., Georgieva, D., Kurdova, R. & Gottstein, B. (2004). *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol. Res.*, 93, 127-130.
- Brunetti, E. & Junghanss, T. (2009). Update on cystic hydatid disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 22, 497-502.
- Brunetti, E., Kern, P., Vuitton, D. A. & Writing Panel for the WHO-IWGE (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.*, 114, 1-16.

- Bruzinskaite, R., Sarkunas, M., Torgerson, P. R., Mathis, A. & Deplazes, P. (2009). Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet. Parasitol.*, 160, 237-241.
- Budke, C. M., Carabin, H., Ndimubanzi, P. C., Nguyen, H., Rainwater, E., Dickey, M., Bhattari, R., Zeziulin, O. & Qian, M. B. (2013). A systematic review of the literature on cystic echinococcosis frequency worldwide and its associated clinical manifestations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 88, 1011-1027.
- Budke, C. M., Deplazes, P. & Torgerson, P. R. (2006). Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 296-303.
- Burgu, A., Doganay, A., Gonenc, B., Sarimehmetoglu, H. O., Kalinbacak, F. (2000). Analysis of fluids of hydatid cysts from sheep by SDS-PAGE and determination of specific antigens in protein structure by Western Blotting. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 24, 493-500.
- Busi, M., Snabel, V., Varcasia, A., Garippa, G., Perrone, V., De Liberato, C. & D'Amelio, S. (2007). Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet. Parasitol.*, 150, 75-83.
- Cabrera, R. (2007). In: Ministerio de salud, G.D.P. (Ed.), Equinococosis quística en el Perú: necesidades de prevención y control de una enfermedad postergada. Lima.
- Cameron, T. W. M. & Webster, G. A. (1969). The histogenesis of the hydatid cyst (*Echinococcus* spp.). Part 1. Liver cysts in large mammals. *Can. J. Zool.*, 47, 1405-1410.
- Cardona, G. A. & Carmena, D. (2013). A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet. Parasitol.*, 192, 10-32.
- Carmena, D., Benito, A. & Eraso, E. (2007). Avances recientes en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 25, 263-269.
- Carmena, D., Martínez, J., Benito, A. & Guisantes, J. A. (2004). Characterization of excretory-secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology*, 129, 371-378.
- Carmena, D., Martínez, J., Benito, A. & Guisantes, J. A. (2005). Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestodo of *Echinococcus granulosus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100, 861-867.
- Castrodale, L. J., Beller, M., Wilson, J. F., Schantz, P. M., McManus, D. P., Zhang, L. H., Fallico, F. G. & Sacco, F. D. (2002). Two atypical cases of cystic echinococcosis (*Echinococcus granulosus*) in Alaska, 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66, 325-327.
- Casulli, A., Interisano, M., Sreter, T., Chitimia, L., Kirkova, Z., La Rosa, G. & Pozio, E. (2012) Genetic variability of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect. Genet. Evol.*, 12, 377-383.
- Casulli, A., Manfredi, M. T., La Rosa, G., Di Cerbo, A. R., Genchi, C. & Pozio, E. (2008). *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet. Parasitol.*, 155, 168-172.

- Casulli, A., Zeyhle, E., Brunetti, E., Pozio, E., Meroni, V., Genco, F., & Filice, C. (2010). Molecular evidence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in humans from Turkana, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *104*, 29-32.
- Cavagion, L., Perez, A., Santillan, G., Zanini, F., Jensen, O., Saldia, L., Diaz, M., Cantoni, G., Herrero, E., Costa, M. T., Volpe, M., Araya, D., Rubianes, N. A., Aguado, C., Meglia, G., Guarnera, E. & Larrieu, E. (2005). Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. *Vet. Parasitol.*, *128*, 73-81.
- Centers for Disease Control and Prevention (2020). Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>. Acceso 6 de octubre de 2020.
- Chaligiannis, I., Maillard, S., Boubaker, G., Spiliotis, M., Saratsis, A., Gottstein, B. & Sotiraki, S. (2015). *Echinococcus granulosus* infection dynamics in livestock of Greece. *Acta Trop.*, *150*, 64-70.
- Chamekh, M., Facon, B., Dissous, C., Haque, A. & Capron, A. (1990). Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Methods*, *134*, 129-137.
- Chemale, G., Ferreira, H. B., Barret, J., Brophy, P. M. & Zaha, A. (2005). *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochem. Biophys. Acta*, *1747*, 189-194.
- Chemale, G. K., Haag, L., Ferreira, H. B. & Zaha, A. (2001). *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *116*, 233-237.
- Chen, X., Zhang, J., Feng, X., Chen, X., Yin, S., Wen, H. & Zheng, S. (2014). Humoural immune response and pathological analysis in patients with false immune diagnosis of cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.*, *36*, 170-176.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, *9*, 1657-1659.
- Coltorti, E. A. & Varela-Diaz, V. M. (1974). *Echinococcus granulosus*: penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cysts. *Exp. Parasitol.*, *35*, 225-231.
- Corrêa, F., Stoore, C., Horlacher, P., Jiménez, M., Hidalgo, C., Alvarez Rojas, C. A., Figueiredo Barros, G., Bunselmeyer Ferreira, H., Hernández, M., Cabrera, G. & Paredes, R. (2018). First description of *Echinococcus ortleppi* and cystic echinococcosis infection status in Chile. *PLoS One*, *13*, e0197620.
- Craig, P. S. & Nelson, G. S. (1984). The detection of circulating antigen in human hydatid disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *78*, 219-227.
- Craig, P. S., Hegglin, D., Lightowers, M. W., Torgerson, P. R. & Wang, Q. (2017). Echinococcosis: Control and Prevention. *Adv. Parasitol.*, *96*, 55-158.
- Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G., Dematteis, S., Camicia, F., Asurmendi, S. & Rosenzvit, M. (2011). Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int. J. Parasitol.*, *41*, 439-448.
- Cucher, M. A., Macchiaroli, N., Baldi, G., Camicia, F., Prada, L., Maldonado, L., Avila, H. G., Fox, A., Gutierrez, A., Negro, P., Lopez, R., Jensen, O., Rosenzvit, M. & Kamenetzky, L. (2016). Cystic

- echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus* sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Trop. Med. Int. Health*, 21, 166-175.
- D'Amelio, R., Pontesilli, O., Dayal, R., de Rosa, F., Barnett, M., Teggi, A., Brighthouse, G. & Lambert, P. H. (1985). Characterization of parasite antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF. *Med. Microbiol. Immunol.*, 174, 43-50.
- Daniel-Mwambete, K., Ponce-Gordo, F. & Cuesta-Bandera, C. (2004). Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop.*, 91, 87-93.
- Debiaggi, M. F., Soriano, S. V., Pierangeli, N. B., Lazzarini, L. E., Pianciola, L. A., Mazzeo, M. L., Moguillansky, S. & Farjat, J. A. B. (2017). Genetic characterization of human hydatid cysts shows coinfection by *Echinococcus canadensis* G7 and *Echinococcus granulosus* sensu stricto G1 in Argentina. *Parasitol. Res.*, 116, 2599-2604.
- Dehkordi, A. B., Sanei, B., Yousefi, M., Sharafi, S. M., Safarnezhad, F., Jafari, R. & Darani, H. Y. (2019). Albendazole and Treatment of Hydatid Cyst: Review of the Literature. *Infect. Disord. Drug Targets.*, 19, 101-104.
- Del Carpio, M., Mercapide, C. H., Salvitti, J. C., Uchiumi, L., Sustercic, J., Panomarenko, H., Moguillansky, J., Herrero, E., Talmon, G., Volpe, M., Araya, D., Mujica, G., Calabro, A., Mancini, S., Chiosso, C., Labanchi, J. L., Saad, R., Goblirsch, S., Brunetti, E. & Larrieu, E. (2012). Early diagnosis, treatment and follow-up of cystic echinococcosis in remote rural areas in Patagonia: impact of ultrasound training of non-specialists. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6, e1444.
- de la Rue, M. L., Dinkel, A., Mackenstedt, U. & Romig, T. (2006). New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 48, 103-104.
- de la Rue, M. L., Takano, K., Brochado, J. F., Costa, C. V., Soares, A. G., Yamano, K., Yagi, K., Katoh, Y. & Takahashi, K. (2011). Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 177, 97-103.
- de la Rue, M. L., Yamano, K., Almeyda, C. E., Ilesbich, M. P., Fernandes, C. D., Goto, A., Kouguchi, H. & Takahashi, K. (2010). Serological reactivity of patients with *Echinococcus* infections (*E. granulosus*, *E. vogeli*, and *E. multilocularis*) against three antigen B subunits. *Parasitol. Res.*, 106, 741-745.
- Delunardo, F., Ortona, E., Margutti, P., Perdicchio, M., Vacirca, D., Teggi, A., Sorice, M. & Siracusano, A. (2010). Identification of a novel 19 kDa *Echinococcus granulosus* antigen. *Acta Trop.*, 113, 42-7.
- Deplazes, P. (2015). Echinococcoses. En: F. Beugnet & L. Halos (Eds.), *Parasitoses & Vector Borne Diseases of Cats*. (pp. 3-7). Lyon: Merial.
- 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.
- Derbala, A. A. & El-Massry, A. A. (1999). Some studies on the growth and development of *Echinococcus granulosus*, camel origin in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, 83, 25-36.

- Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. (2011a). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends Parasitol.*, 27, 264-273.
- Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoien, F., Lin, G., Previato, J. O. & Ferreira, F. (2011b). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol.*, 27, 204-213.
- Díaz, A., Fernandez, C., Pittiioni, A., Seoane, P.I., Allen, J. E. & Casaravilla, C. (2015). The laminated layer: recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Exp. Parasitol.*, 158, 23-30.
- Dinkel, A., Njoroge, E. M., Zimmermann, A., Wälz, M., Zeyhle, E., Elmahdi, I., 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.
- Dirección Provincial de Estadísticas y Censos de Neuquén. (2020). Disponible en www.estadisticaneuquen.gob.ar . Acceso 6 de agosto de 2020.
- Djuricic, S. M., Grebeldinger, S., Kafka, D.I., Djan, I., Vukadin, M. & Vasiljevic, Z. M. (2010). Cystic echinococcosis in children -the seventeen- year experience of two large medical centers in Serbia. *Parasitol. Int.*, 59, 257–261.
- Dopchiz, M. C., Elissondo, M. C., Rossin, M. A. & Denegri, G. (2007). Hydatidosis cases in one of Mar del Plata hospitals, Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 40, 635–639.
- Dreweck, C. M., Lüder, C. G. K., Soboslay, P. T. & Kern, P. (1997). Subclasses-specific serological reactivity and IgG4-specific antigen recognition in human echinococcosis. *Trop. Med. Int. Health.*, 8, 779-787.
- Dueger, E. L. & Gilman, R. H. (2001). Prevalence, intensity, and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central Peruvian Andes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95, 379-83.
- Duishanbai, S., Jiafu, D., Guo, H., Liu, C., Liu, B., Aishalong, M., Mijiti, M. & Wen, H. (2010). Intracranial hydatid cyst in children: report of 30 cases. *Childs Nerv. Syst.*, 26, 821-827.
- Dybcicz, M., Gierczak, A., Dąbrowska, J., Rdzanek, Ł. & Michałowicz, B. (2013) Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central zhaPoland. *Parasitol. Int.*, 62, 364–367.
- Eckert, J. & Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 107-135.
- Eckert, J., Deplazes, P., Craig, P. S., Gemmell, M. A., Gottstein, B., Heath, D., Jenkins, D. J., Kamiya, M. & Lightowers, M. (2001). Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. En: Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. X. & Pawlowski, Z., (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals*. (pp. 73-100). Ginebra/París: WHO/OIE.
- Eckert, J., Thompson, R. C. A., Lymbery, A. J., Pawlowski, Z. S., Gottstein, B. & Morgan, U. M. (1993). Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitol. Res.*, 79, 42-48.
- Ertuğ, S., Çalışkan, S.Ö., Malatyali, E. & Ertabaklar, H. (2018) Investigation of the Applicability of a Rapid Diagnosis Test in the Diagnosis of Cystic Echinococcosis. *Turkiye Parazit. Derg.*, 42, 118-121.

- Escobari de Querejazu, L. (1985). *Producción y comercio en el espacio sur andino en el siglo XVII: Cuzco-Potosí, 1650-1700*, Embajada de España en Bolivia.
- Espinoza, S., Salas, A. M., Vargas, A., Freire, V., Diaz, E., Sanchez, G. & Venegas, J. (2014). Detection of the G3 genotype of *Echinococcus granulosus* from hydatid cysts of Chilean cattle using *COX1* and *ND1* mitochondrial markers. *Parasitol. Res.*, *113*, 139-147.
- Farhadi, M., Fazaeli, A. & Haniloo, A. (2015). Genetic characterization of livestock and human hydatid cyst isolates from northwest Iran, using the mitochondrial *cox1* gene sequence. *Parasitol. Res.*, *114*, 4363-4370.
- Fernández, V. H., Ferreira, B., Fernández, C., Zaha, A. & Nieto, A. (1996). Molecular characterization of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *77*, 247-250.
- Fica, A., Soto, A., Slater, J., Peralta, M., Humeres, R., Castro, M., González, J. & Weitzel, T. (2012). Clinical presentation of hydatid disease during 15 years: a case series from Santiago, Chile. *Rev. chil. infectol.*, *29*, 183-191.
- Folle, A. M., Kitano, E. S., Lima A., Gil M., Cucher, M., Mourglia-Ettlin, G., Iwai, L. K., Rosenzvit, M., Batthyány, C. & Ferreira, A. M. (2017). Characterisation of Antigen B Protein Species Present in the Hydatid Cyst Fluid of *Echinococcus canadensis* G7 Genotype. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, e0005250.
- Frider, B. & Larrieu, E. (2010). Treatment of liver hydatidosis: how to treat an asymptomatic carrier? *World J. Gastroenterol.*, *16*, 4123-4129.
- Frider, B., Larrieu, E. & Odriozola, M. (1999). Long-term outcome of asymptomatic liver hydatidosis. *J. Hepatol.*, *30*, 228–231.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genet.*, *147*, 915-925.
- Gallagher, S. (2007). One-dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. En: F. M. Ausubel (Ed.), *Current Protocols in Cell Biology*. (pp. 6.1.1- 6.1.38). New York/Estados Unidos: Greene Pub. Associates; Wiley-Interscience.
- Gallagher, S., Winston, S., Fuller, S. A. & Hurrell, J. G. R. (2011). Immunoblotting and immunodetection. En: J. Bonifacino (Ed.). *Current Protocols in Cell Biology*. (pp. 6.2.1-6.2.28). Nueva York/Estados Unidos: John Wiley & Sons Inc.
- García Llamazares, J. L., Álvarez de Felipe, A. I., Redondo Cerdeña, P. A. & Prieto Fernández, J. G. (1997). Estudio de la fertilidad y viabilidad de quistes hidatídicos ovinos. *Rev. Esp. Salud Pública*, *71*, 445-449.
- Gemmell, M. A. & Roberts, M. G. (1995). Modelling *Echinococcus* life cycles. En: R. C. A. Thompson & A. J. Lymbery (Eds.), *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. (pp. 333-354). Londres/Reino Unido: George Allan and Unwin.
- Gemmell, M. A., Roberts, M. G., Berard, T. C. & Lawson, J. R (2001). Epidemiology. En: J. Eckert, M. A. Gemmell, F. X. Meslin, Z. Pawlowski (Eds.). *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals*. (p. 143-161). Ginebra/París: WHO/OIE.

- González, L. M., Daniel-Mwambete, K., Montero, E., Rosenzvit, M. C., McManus, D. P., Garate, T. & Cuesta-Bandera, C. (2002). Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp. Parasitol.*, *102*, 46-56.
- Gori, F., Armua-Fernandez, M. T., Milanese, P., Serafini, M., Magi, M., Deplazes, P. & Macchioni, F. (2015). The occurrence of taeniids of wolves in Liguria (northern Italy). *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.*, *4*, 252-255.
- Gottstein, B., Dai, W. J., Walker, M., Stettler, M., Müller, N. & Hemphill, A. (2002). An intact laminated layer is important for the establishment of secondary *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasitol. Res.*, *88*, 822-828.
- Gottstein, B., Eckert, J., Michael, S. A. & Thompson, R. C. A. (1987). *Echinococcus granulosus* antigens: immunoelectrophoretic and Western blot analysis of hydatid cysts fluids. *Parasitol. Res.*, *73*, 186-189.
- Grenouillet, F., Umhang, G., Arbez-Gindre, F., Manton, G., Delabrousse, E., Millon, L. & Boue, F., (2014). *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. *Emerg. Infect. Dis.*, *20*, 2100-2102.
- Gottstein, B., Soboslay, P., Ortona, E., Wang, J., Siracusano, A. & Vuitton, D. A. (2017). Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE). *Adv. Parasitol.*, *96*, 1-54.
- Guarnera, E. (2009). Hidatidosis en Argentina: carga de enfermedad. 1ª Edición. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud.
- Guarnera, E. A., Parra, A., Kamenetzky, L., Garcia, G. & Gutierrez, A. (2004). Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop.*, *92*, 153-159.
- Guerra, D., Armua-Fernandez, M. T., Silva, M., Bravo, I., Santos, N., Deplazes, P. & Madeira de Carvalho, L. M. (2013). Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus* spp. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, *2*, 50-53.
- Gun, E., Etit, D., Buyuktalanci, D. O. & Cakalagaoglu, F. (2017). Unusual locations of hydatid disease: A 10-year experience from a tertiary reference center in Western Turkey. *Ann. Diagn. Pathol.*, *29*, 37-40.
- Haag, K. L., Alves-Junior, L., Zaha, A. & Ayala, F. J. (2004). Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene*, *333*, 157-167.
- Haag, K. L., Araujo, A. M., Gottstein, B., Siles-Lucas, M., Thompson, R. C. & Zaha, A. (1999). Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitol.*, *118*, 63-71.
- Haag, K. L., Zanotto, P. M., Alves-Junior, L., Gasser, R. B., Zaha, A. & Ayala, F. J. (2006). Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infect. Genet. Evol.*, *6*, 251-261.
- Hadipour, M., Nazari, M., Sanei, B., Ghayour, Z., Sharafi, S. M., Yazdani, H. & Darani, H. Y. (2016). Immunological diagnosis of human hydatid cyst using Western immunoblotting technique. *J. Res. Med. Sci.*, *21*, 130.

- Han, X., Jian, Y., Zhang, X., Ma, L., Zhu, W., Cai, Q., Wu, S., Wang, X. & Shi, B. (2019). Genetic characterization of *Echinococcus* isolates from various intermediate hosts in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China. *Parasitology*, *146*, 1-8.
- Hatch, C. (1970). *Echinococcus granulosus* equinus in Irish dogs. *Vet. Rec.*, *86*, 632-633.
- Heath, D. D. (1971). The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *T. serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host. *Int. J. Parasitol.*, *1*, 145-152.
- Hemphill, A. & Muller, J. (2009). Alveolar and cystic echinococcosis: towards novel chemotherapeutical treatment options. *J. Helminthol.*, *83*, 99-111.
- Hemphill, A., Stadelmann, B., Scholl, S., Muller, J., Spiliotis, M., Muller, N., Gottstein, B. & Siles-Lucas, M. (2010). *Echinococcus* metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. *Parasitol.*, *137*, 569-587.
- Hernández-González, A., Sánchez-Ovejero, C., Manzano-Román, R., González Sánchez, M., Delgado, J. M., Pardo-García, T., Soriano-Gálvez, F., Akhan, O., Cretu, C. M., Vutova, K., Tamarozzi, F., Mariconti, M., Brunetti, E., Vola, A., Fabiani, M., Casulli, A. & Siles-Lucas M. (2018). Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid, in IgG-ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *12*, e0006741.
- Hernández-González, A., Santivañez, S., García, H. H., Rodríguez, S., Muñoz, S., Ramos, G., Orduña, A. & Siles-Lucas, M. (2012). Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *6*, e1714.
- Hidalgo, C., Stoores, C., Pereira, I., Paredes, R. & Alvarez Rojas, C. A. (2020). Multiple haplotypes of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in single naturally infected intermediate hosts. *Parasitol. Res.*, *119*(2), 763-770.
- Hosch, W., Junghanss, T., Stojkovic, M., Brunetti, E., Heye, T., Kauffmann, G. W. & Hull, W. E. (2008). Metabolic viability assessment of cystic echinococcosis using highfield 1H MRS of cyst contents. *NMR Biomed.*, *21*, 734-754.
- Hüttner, M., Nakao, M., Wassermann, T., Siefert, L., Boomker, J. D., Dinkel, A., Sako, Y., Mackenstedt, U., Romig, T. & Ito, A. (2008). Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int. J. Parasitol.*, *38*, 861-868.
- Hüttner, M., Siefert, L., Mackenstedt, U. & Romig, T. (2009). A survey of *Echinococcus* species in wild carnivores and livestock in East Africa. *Int. J. Parasitol.* *39*, 1269-1276.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) (2008). *Censo nacional agropecuario 2008*. http://www.indec.mecon.gov.ar/agropecuario/ampliada_index.asp?mode=58. Acceso 25 de marzo de 2020.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2020). Provincia de Neuquén http://www.estadisticaneuquen.gob.ar/index.php?sec=aplicacion_neuquen_numeros. Acceso 6 de agosto de 2020.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) (2020). Provincia de Neuquén <https://www.estadisticaneuquen.gob.ar/#/ganaderia>. Acceso 6 de agosto de 2020.

- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2004). Sistema de Soporte de Decisiones- Provincia de Neuquén. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (<http://www.inta.gov.ar/bariloche/nqn>). Acceso 6 de agosto de 2020.
- Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Profumo, E., Franchi, C., Ortona, E., Rigano, R. & Siracusano, A. (1996). Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.*, *18*, 571-578.
- Irabuena, O., Nieto, A., Ferreira, A. M., Battistoni, J. & Ferragut, G. (2000). Characterization and optimization of bovine *Echinococcus granulosus* cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, *42*, 255-262.
- Ito, A., Chuluunbaatar, G., Yanagida, T., Davaasuren, A., Sumiya, B., Asakawa, M., Ki, T., Nakaya, K., Davaajav, A., Dorjsuren, T., Nakao, M. & Sako, Y. (2013). *Echinococcus* species from red foxes, corsac foxes, and wolves in Mongolia. *Parasitology*, *140*, 1648-1654.
- Ito, A., Dorjsuren, T., Davaasuren, A., Yanagida, T., Sako, Y., Nakaya, K., Nakao, M., Bat-Ochir, O. E., Ayushkhuu, T., Bazarragchaa, N., Gonchigsengee, N., Li, T., Agvaandaram, G., Davaajav, A., Boldbaatar, C. & Chuluunbaatar, G. (2014). Cystic echinococcoses in Mongolia: molecular identification, serology and risk factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *8*, e2937.
- Jabbar, A., Narankhajid, M., Nolan, M. J., Jex, A. R., Campbell, B. E. & Gasser, R. B. (2011). A first insight into the genotypes of *Echinococcus granulosus* from humans in Mongolia. *Mol. Cell. Probes*, *25*, 49–54.
- Jordanova, D. P., Harizanov, R. N., Kaftandjiev, I. T., Rainova, I. G. & Kantardjiev, T. V. (2015). Cystic echinococcosis in Bulgaria 1996-2013, with emphasis on childhood infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, *34*, 1423-1428.
- Junghanss, T., da Silva, A., Horton, J., Chiodini, P. & Brunetti, E. (2008). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems and perspectives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *79*, 301-311.
- Kamenetzky, L., Gutierrez, A. M., Canova, S. G., Haag, K. L., Guarnera, E. A., Parra, A., Garcia, G. E. & Rosenzvit, M. C. (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect. Genet. Evol.*, *2*, 129-136.
- Kamenetzky, L., Muzulin, P. M., Gutierrez, A. M., Angel, S. O., Zaha, A., Guarnera, E. A. & Rosenzvit, M.C. (2005). High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol.*, *131*, 805-815.
- Kanwar, J. R., Kaushik, S. P., Sawhney, M. S., Kamboj, M. S., Mehta, S. K. & Vinayak, V. K. (1992). Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognized by immunoblotting. *J. Med. Microbiol.*, *36*, 46-51.
- Karavias, D., Vagianos, C., Kakkos, S., Panagopoulos, C. & Androulakis, J. (1996). Peritoneal echinococcosis. *World J. Surg.*, *20*, 337- 340.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*, 1647–1649.

- Kedra, A. H., Swiderski, Z., Tkach, V., Dubinsky, P., Pawlowski, Z., Stefaniak, J. & Pawlowski, J. (1999). Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitol.*, 44, 248-254.
- Kesik, H. K., Simsek, S., Kilinc, S. G. & Koroglu, E. (2019) Identification of antigen B (AgB) Gene polymorphism in cattle and sheep isolates of *Echinococcus granulosus* and investigation of effects on serological diagnosis. *Acta Trop.*, 199, 105099.
- Kern, P., Menezes da Silva, A., Akhan, O., Müllhaupt, B., Vizcaychipi, K. A., Budke, C. & Vuitton, D. A. (2017). The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. *Adv. Parasitol.*, 96, 259-369.
- Khosravi, A., Ghafourian, S., Shamsi, M., Sadeghifard, N., Maleki, A. & Babaahmadi, E. (2012). Cross-reaction between the crude hydatid cyst fluid antigens of human and animals origin in response to human IgG class and subclasses. *J. Parasitol. Res.*, 947848.
- Kilejian, A. & Schwabe, C. W. (1971). Studies on the polysaccharides of the *Echinococcus granulosus* cyst, with observations on a possible mechanism for laminated membrane formation. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 40, 25-36.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111-120.
- 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.
- Konyaev, S. V., Yanagida, T., Ivanov, M. V., Ruppel, V. V., Sako, Y., Nakao, M. & Ito, A. (2012b). The first report on cystic echinococcosis in a cat caused by *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1). *J. Helminthol.*, 86, 391-394.
- Konyaev, S. V., Yanagida, T., Ingovatova, G. M., Shoikhet, Y. N., Nakao, M., Sako, Y., Bondarev, A. Y. & Ito, A. (2012a). Molecular identification of human echinococcosis in the Altai region of Russia. *Parasitol. Int.*, 61, 711–714.
- Konyaev, S. V., Yanagida, T., Nakao, M., Ingovatova, G. M., Shoykhet, Y. N., Bondarev, A. Y., Odnokurtsev, V. A., Loskutova, K. S., Lukmanova, G. I., Dokuchaev, N. E., Spiridonov, S., Alshinecky, M. V., Sivkova, T. N., Andreyanov, O. N., Abramov, S. A., Krivopalov, A. V., Karpenko, S. V., Lopatina, N. V., Dupal, T. A., Sako, Y. & Ito, A. (2013). Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. *Parasitology*, 140, 1637-1647.
- Kumaratilake, L. M., Thompson, R. C. A. & Eckert, J. (1986). *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *Int. J. Parasitol.*, 16, 529-540.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lahmar, S., Rebaï, W., Boufana, B. S., Craig, P. S., Ksantini, R., Daghfous, A., Chebbi, F., Fteriche, F., Bedioui, H., Jouini, M., Dhibi, M., Makni, A., Ayadi, M. S., Ammous, A., Kacem, M. J. & Ben

- Safta, Z. (2009). Cystic echinococcosis in Tunisia: analysis of hydatid cysts that have been surgically removed from patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *103*, 593-604.
- Larrieu, E. J., & Frider, B. (2001). Human cystic echinococcosis: contributions to the natural history of the disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *95*, 679–687.
- Latif, A. A., Tanveer, A., Maqbool, A., Siddiqi, N., Kyaw-Tanner, M. & Traub, R. J. (2010). Morphological and molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* in livestock and humans in Punjab, Pakistan. *Vet. Parasitol.*, *170*, 44-49.
- Laurimäe, T., Kinkar, L., Moks, E., Romig, T., Omer, R. A., Casulli, A., Umhang, G., Bagrade, G., Irshadullah, M., Sharbatkhor, 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.
- Lavikainen, A., Lehtinen, M. J., Laaksonen, S., Agren, E., Oksanen, A. & Meri, S. (2006). Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology*, *133*, 565-570.
- Lavikainen, A., Lehtinen, M. J., Meri, T., Hirvela-Koski, V. & Meri, S. (2003). Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, *127*, 207-215.
- Li, T., Ito, A., Pengcui, R., Sako, Y., Chen, X., Qiu, D., Xiao, N. & Craig, P. S. (2011). Post-treatment follow up study of abdominal cystic echinococcosis in tibetan communities of northwest Sichuan Province, China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*, e1364.
- Liance, M., Janin, V., Bresson-Hadni, S., Vuitton, D. A., Houin, R. & Piarroux, R. (2000). Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. *J. Clin. Microbiol.*, *38*, 3718-3721.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, *25*, 1451–1452.
- Lightowlers, M. W., Liu, D. Y., Haralambous, A. & Rickard, M. D. (1989). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *37*, 171-182.
- Lissandrin, R., Tamarozzi, F., Piccoli, L., Tinelli, C., De Silvestri, A., Mariconti, M., Meroni, V., Genco, F. & Brunetti, E. (2016). Factors Influencing the serological response in hepatic *Echinococcus granulosus* Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *94*, 166–171.
- Liu, Q., Cao, L., Zhang, Y., Xu, D., Shang, L., Wang, X., Wei, F., Xiao, L., Ma, R., Cai, J. & Zhao, Q. (2013). Genotypes of *Echinococcus granulosus* in animals from Yushu, Northeastern China. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, *13*, 134-137.
- Lopez-Neyra, C. R. & Soler Planas, M. A. (1943). Revisión del género *Echinococcus* Rud y descripción de una especie nueva parasitaria intestinal del perro en Almería. *Revista ibérica de parasitología*, *3*, 169–194.
- Lorenzo, C., Ferreira, H. B., Monteiro, K., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., García, H. H., Vasquez, Y., Naquira, C., Sanchez, E., Lorca, M., Contreras, M., Last, J. A. & González-Sapienza, G. (2005).

- Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J. Clin. Microbiol.*, *43*, 2764-2770.
- Lorenzo, C., Salinas, G., Brugnini, A., Wernstedt, C., Hellman, U. & González-Sapienza, G., (2003). *Echinococcus granulosus* antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family. *Biochem. J.*, *369*, 191-198.
- Loudiye, H., Aktaou, S., Hassikou, H., El-Bardouni, A., El-Manouar, M., Fizazi, M., Tazi, A. & Hajjaj-Hassouni, N. (2003). Hydatid disease of bone. Review of 11 cases. *Joint Bone Spine*, *70*, 352-355.
- Lymbery, A. J. (2017). Phylogenetic Pattern, Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.*, *95*, 111-145.
- Macpherson, C. N. L. (2001). Epidemiology of *Echinococcus granulosus* in transhumant situations. En: J. Eckert, M. A. Gemmell, F. X. Meslin, Z. Pawlowski (Eds.), WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals. (pp. 156–161). Geneva/Paris: WHO/OIE.
- Maillard, S., Benchikh-Elfegoun, M. C., Knapp, J., Bart, J. M., Koskei, P., Gottstein, B. & Piarroux, R. (2007). Taxonomic position and genetic distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three–african countries. *Parasitol. Res.*, *100*, 495-503.
- Maillard, S., Gottstein, B., Haag, K. L., Ma, S., Colovic, I., Benchikh-Elfegoun, M. C., Knapp, J. & Piarroux, R. (2009). The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite: a new tool to investigate genetic diversity of *Echinococcus granulosus* sensu lato. *J. Clin. Microbiol.*, *47*, 3608-3616.
- Maity, A., Bhattacharya, D., Batabyal, S., Chattopadhyay, S., Bera, A. K. & Karmakar, P. K. (2007). *Echinococcus granulosus* of buffalo in India: Partial characterization of excretory-secretory and germinal membrane antigens. *Vet. Res. Commun.*, *31*, 457-460.
- Mamuti, W., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakaya, K., Nakao, M., Lightowlers, M. W. & Ito, A. (2002). Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, *9*, 573-576.
- Manterola, C., Benavente, F., Melo, A., Vial, M. & Roa, J.C. (2008). Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitol. Int.*, *57*, 342-346.
- Manterola, C., Mansilla, J. A. & Fonseca, F. (2005). Preoperative albendazole and scolices viability in patients with hepatic echinococcosis. *World J. Surg.*, *29*, 750–753.
- Manzano-Román, R., Sánchez-Ovejero, C., Hernández-González, A., Casulli, A. & Siles-Lucas, M. (2015). Serological diagnosis and follow-up of human cystic echinococcosis: a New Hope for the future? *Biomed. Res. Int.* e428205.
- Maravilla, P., Thompson, A.R.C., Palacios-Ruiz, J.A., Estcourt, A., Ramirez-Solis, E., Mondragon-de-la-Pena, C., Moreno-Moller, M., Cardenas-Mejia, A., Mata-Miranda, P., Aguirre-Alcantara, M.T., Bonilla-Rodriguez, C. & Flisser, A. (2004). *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop.*, *92*, 231-236.

- Marcinkuté, A., Sarkūnas, M., Moks, E., Saarma, U., Jokelainen, P., Bagrade, G., Laivacuma, S., Strupas, K., Sokolovas, V. & Deplazes, P. (2015). *Echinococcus* infections in the Baltic region. *Vet. Parasitol.*, *213*, 121-131.
- Margni, R., Malchiodi, E. & Chiaramonte, M. G. (1996). Electroforesis en gel de poliacrilamida; isoelectroenfocado; inmunotransferencia ("immunoblotting"). En: R. Margni. (Ed.), *Inmunología e Inmunoquímica*. (pp. 906-922). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Mariconti, M., Bazzocchi, C., Tamarozzi, F., Meroni, V., Genco, F., Maserati, R. & Brunetti, E. (2014). Immunoblotting with human native antigen shows stage-related sensitivity in the serodiagnosis of hepatic cystic echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *90*, 75-9.
- McManus, D. P., Zhang, L., Castrodale, L. J., Le, T. H., Pearson, M. & Blair, D. (2002). Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *67*, 296-298.
- McManus, D. P., Zhang, W., Li, J. & Bartley, P. B. (2003). Echinococcosis. *Lancet.*, *362*, 1295–304.
- Ministerio de la Salud, Gobierno de la Provincia del Neuquén. (2012). Guía provincial para manejo de la hidatidosis hepática.
- Ministerio de Producción y Turismo (2020). Subsecretaría de Producción, Neuquén. Plan Provincial de Granja. https://www.agroindustria.gob.ar › _archivos › 000002-manual neuquen. Acceso 25 de marzo de 2020.
- Mitrea, I. L., Ionita, M., Costin, I. I., Predoi, G., Avram, E., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Cringoli, G. & Genchi, C. (2014). Occurrence and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in naturally infected adult sheep and cattle in Romania. *Vet. Parasitol.*, *206*, 159-166.
- Mogoye, B. K., Menezes, C. N., Wong, M. L., Stacey, S., von Delft, D., Wahlers, K., Wassermann, M., Romig, T., Kern, P., Grobusch, M. P. & Frean, J. (2013). First insights into species and genotypes of *Echinococcus* in South Africa. *Vet. Parasitol.*, *196*, 427-432.
- Mohammed, A. A., Allen, J. T. & Rogan, M. T. (2018). *Echinococcus granulosus* cyst fluid enhances epithelial-mesenchymal transition. *Parasite Immunol.*, *40*, e12533.
- Moks, E., Jõgisalu, I., Valdmann, H. & Saarma, U. (2008). First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology*, *135*, 647-54.
- Monteiro, D. U., Botton, S. A., Tonin, A. A., Azevedo, M. I., Graichen, D. A., Noal, C. B. & de la Rue, M. L. (2014). *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) in swine of southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, *202*, 335-338.
- Monteiro, K. M., Cardoso, M. B., Follmer, C., da Silveira, N. P., Vargas, D. M., Kitajima, E. W., Zaha, A. & Ferreira, H. B. (2012). *Echinococcus granulosus* antigen B structure: subunit composition and oligomeric states. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *6*, e1551.
- Moral, I. (2010). In: Ministerio de Salud, G.D.A. (Ed.), Hidatidosis, diagnóstico para el equipo de salud (Buenos Aires, Argentina).
- Moro, P. L., Nakao, M., Ito, A., Schantz, P. M., Cavero, C. & Cabrera, L. (2009). Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol. Int.*, *58*, 184-186.
- Moro, P. & Schantz, P.M. (2009). Echinococcosis: a review. *Int. J. Inf. Dis.*, *13*, 125-133.

- Morseth, D. J. (1965). Ultrastructure of developing taeniid embryophores and associated structures. *Exp. Parasitol.*, *16*, 207-216.
- 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.
- Muzulin, P. M., Kamenetzky, L., Gutierrez, A. M., Guarnera, E. A. & Rosenzvit, M. C. (2008). *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. *Exp. Parasitol.*, *118*, 156-164.
- Nakao, M., Lavikainen, A. & Hoberg, E. (2015). Is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends Parasitol.*, *31*, 342-343.
- Nakao, M., Li, T., Han, X., Ma, X., Xiao, N., Qiu, J., Wang, H., Yanagida, T., Mamuti, W., Wen, H., Moro, P. L., Giraudoux, P., Craig, P. S. & Ito, A. (2010). Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, *40*, 379-385.
- Nakao, M., McManus, D. P., Schantz, P. M., Craig, P. S. & Ito, A. (2007). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, *134*, 713-722.
- Nakao, M., Sako, Y., Yokoyama, N., Fukunaga, M. & Ito, A. (2000). Mitochondrial genetic code in cestodes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *111*, 415-24.
- Nakao, M., Yanagida, T., Konyaev, S., Lavikainen, A., Odnokurtsev, V.A., Zaikov, V.A. & Ito, A. (2013) Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology*, *140*, 1625-1636.
- Nusilaiti, M. & Yan Hao, Z. (2016). Echinococcosis (hydatid disease) infection in livestock in 14 areas in Xinjiang, 2014. *Chin. J. Zoonoses*, *32*, 202-205.
- Obwaller, A., Schneider, R., Walochnik, J., Gollackner, B., Deutz, A., Janitschke, K., Aspöck, H. & Auer, H. (2004). *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology*, *128*, 569-575.
- Oksanen, A. & Lavikainen, A. (2015). *Echinococcus canadensis* transmission in the North. *Vet. Parasitol.*, *213*, 182-186.
- Omer, R. A., Dinkel, A., Romig, T., Mackenstedt, U., Elnahas, A. A., Aradaib, I. E., Ahmed, M. E., Elmalik, K. H. & Adam, A. (2010). A molecular survey of cystic echinococcosis in Sudan. *Vet. Parasitol.*, *169*, 340-346.
- Onac, D., Gyorke, A., Oltean, M., Gavrea, R. & Cozma, V. (2013). First detection of *Echinococcus granulosus* G1 and G7 in wild boars (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Romania using PCR and PCR-RFLP techniques. *Vet. Parasitol.*, *193*, 289-291.
- Ordiozola, N. & Pettinari, R. (1998). Relato oficial Hidatidosis abdominal. *Rev. Arg. Cir.* Número extraordinario, 9-74.

- Ortlepp, J.R. (1934). *Echinococcus* in dogs from Pretoria and vicinity. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, 3, 97-108.
- Ortlepp, R. J. (1937). South African helminths, part I. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, 9, 311-336.
- Papanikolaou, A., (2008). Osseous hydatid disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102, 233-238.
- Ortona, E., Margutti, P., Delunardo, F., Nobili, V., Profumo, E., Riganò, R., Buttari, B., Carulli, G., Azzara, A., Teggi, A., Bruschi, F. & Siracusano A. (2005). Screening of an *Echinococcus granulosus* cDNA library with IgG4 from patients with cystic echinococcosis identifies a new tegumental protein involved in the immune escape. *Clin Exp. Immunol.*, 142, 528-538.
- Ortona, E., Margutti, P., Delunardo, F., Vaccari, S., Riganò, R., Profumo, E., Buttari, B., Teggi, A. & Siracusano A. (2003). Molecular and immunological characterization of the C-terminal region of a new *Echinococcus granulosus* Heath Shock Protein 70. *Parasite Immunol.*, 25, 119-126.
- Pozzuoli, R., Piantelli, M., Perucci, C., Arru, E. & Musiani, P. (1975). Isolation of the most immunoreactive antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *J. Immunol.*, 115, 1459-1463.
- Oudni-M'rad, M., M'rad, S., Ksia, A., Lamiri, R., Mekki, M., Nouri, A., Mezhoud, H. & Babba, H. (2016). First molecular evidence of the simultaneous human infection with two species of *Echinococcus granulosus* sensu lato: *Echinococcus granulosus* sensu stricto and *Echinococcus canadensis*. *Parasitol. Res.*, 115, 1065-1069.
- Ozsay, O., Gungor, F., Karaisli, S., Kokulu, I. & Dilek, O. N. (2018). Hydatid cyst of the pancreas causing both acute pancreatitis and splenic vein thrombosis. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 100, e178-180.
- Pan, D., Bera, A. K., Bandyopadhyay, S., Das, S., Rana, T., Das, S. K., Bandyopadhyay, S, Manna, B. & Bhattacharya, D. (2011). Molecular characterization of antigen B2 subunit in two genotypes of *Echinococcus granulosus* from Indian bubaline isolates, its stage specific expression and serological evaluation. *Mol. Biol. Rep.*, 38, 2067-2073.
- Pavletic, C. F., Larrieu, E., Guarnera, E.A., Casas, N., Irabedra, P., Ferreira, C., Sayes, J., Gavidia, C.M., Caldas, E., Lise, M. L. Z., Maxwell, M., Arezo, M., Navarro, A.M., Vigilato, M. A. N., Cosivi, O., Espinal, M. & Vilas, V. J. D. R. (2017). Cystic echinococcosis in South America: a call for action. *Rev. Panam. Salud Publica*, 41, e42.
- Pawlowski, Z. S. (1997). Critical points in the clinical management of cystic Echinococcosis: a revised review. En: F. L. Andersen, H. Ouhelli, M. Kachani (Eds.), in compendium on cystic echinococcosis, in Africa and in middle-east countries with special reference to Morocco. (pp. 119-135). Provo/Estados Unidos: Brigham Young University.
- Pawlowski, Z. S., Eckert, J., Vuitton, D. A., Ammann, R. W., Kern, P., Craig, P. S., Dar, K. F., De Rosa, F., Filice, C., Gottstein, B., Grimm, F., Macpherson, C. N. L., Sato, N., Todorov, T., Uchino, J., von Sinner, W. & Wen, H. (2001). Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. En: Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. X. & Pawlowski, Z. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals*. (pp. 20-69). Ginebra/París: WHO/OIE.

- Pednekar, R. P., Gatne, M. L., Thompson, R. C. A. & Traub, R. J. (2009). Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet. Parasitol.*, 165, 58-65.
- Pierangeli, N. B. (2013). Caracterización biológica, inmunológica y molecular de la infección por *Echinococcus granulosus* y de la dinámica de transmisión de la echinococcosis quística en Neuquén, Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Pierangeli N. B. & Debiaggi M. F. (2014). Evaluación de la dinámica de transmisión de *E. granulosus* en hospedadores intermediarios de Neuquén. En: J. Basualdo Farjat, D. Enría, P. Martino, M. Rosenzvit & A. Seijo (Ed.), *Temas de Zoonosis VI*. (pp. 375-383). Buenos Aires/Argentina: Editorial Asociación Argentina de Zoonosis.
- Pierangeli, N. B., Soriano, S. V., Rocca, I., Bergagna, H. F., Lazzarini, L. E., Celescinco, A., Kossman, A. V., Saiz, M. S. & Basualdo, J. A. (2010). Usefulness and validation of a coproantigen test for dog echinococcosis screening in the consolidation phase of hydatid control in Neuquén, Argentina. *Parasitol. Int.*, 59, 394-399.
- Pierangeli, N. B., Soriano, S. V., Rocca, I., Giménez, J., Lazzarini, L. E., Grenóvero, M. S., Menestrina, C. & Basualdo, J. A. (2007). Heterogeneous distribution of human cystic echinococcosis after a long-term control program in Neuquén, Patagonia Argentina. *Parasitol. Int.*, 56, 149-155.
- Plesker, R., Nadler, T., Dinkel, A. & Romig, T. (2009). A case of an *Echinococcus ortleppi* infestation in a red-shanked douc langur (*Pygathrix nemaeus*) in northern Vietnam. *Vietnam. J. Primatol.*, 3, 75-81.
- Polzin, T. & Vahdati Daneshmand, S. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper. Res. Lett.*, 31, 12-20.
- Rafiei, A. & Craig, P. S. (2002). The immunodiagnostic potential of protoscolex antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 96, 383-389.
- Rahimi, H., Sadjjadi, S. M. & Sarkari, B. (2011). Performance of antigen B isolated from different hosts and cyst locations in diagnosis of cystic echinococcosis. *Iranian J. Parasitol.*, 6, 12-19.
- Ramos, G., Orduña, A. & García-Yuste, M. (2001). Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. *World J. Surg.*, 25, 46-57.
- Ramos-Sarmiento, D. & Chiluisa-Utreras, V. (2020). First molecular identification of hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* sensu lato G6/G7 in Ecuador. *J. Helminthol.*, 94, 1-4.
- Ramteke, P., Phulware, R. H., Shende, T., Sahoo, B. & Barwad, A. (2019). Hydatid cyst of femur, radiologically mimicking a sarcoma. *Diagn. Cytopathol.*, 1-4.
- Rausch, R. L. (1997). *Echinococcus granulosus*: biology and ecology. En: F. L. Anderson, H. Ouhelli, M. Kachani (Eds.), *Compendium of Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco*. (pp. 18-53). Provo/Estados Unidos: Brigham Young University.

- Rausch, R. L. & Williamson, F. S. (1959). Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXIV. The parasites of wolves, *Canis lupus*. *L. J. Parasitol.*, *45*, 395-403.
- Riganò, R., Buttari, B., Profumo, E., Ortona, E., Delunardo, F., Margutti, P., Mattei, V., Teggi, A., Sorice, M. & Siracusano, A. (2007). *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect. Immun.*, *75*, 1667-1678.
- Riganò, R., Profumo, E., Bruschi, F., Carulli, G., Azzarà, A., Ioppolo, S., Buttari, B., Ortona, E., Margutti, P., Teggi, A. & Siracusano, A. (2001). Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immun.*, *69*, 288-296.
- Riganò, R., Profumo, E., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Teggi, A. & Siracusano, A. (1999). Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.*, *115*, 503-507.
- Roccia, I., Debiaggi, M. F., Dalla Villa, J. P., Lazzarini, L. E., Soriano, S. V., Lucero, E. M., Sangüesa, G.J. & Pierangeli, N.B. (2018). Evaluación de casos de hidatidosis en niños y su relación con la contaminación ambiental con *Echinococcus* sp. en Neuquén mediante sistemas de información geográfica. *Rev. Arg. Parasitol. Num.*, *7*, 36. ISSN: 2313-9862.
- Rogan, M. T., Hai, W. Y., Richardson, R., Zeyhle, E. & Craig, P. S. (2006). Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends Parasitol.*, *22*, 431-438.
- Roinioti, E., Papathanassopoulou, A., Theodoropoulou, I., Simsek, S. & Theodoropoulos, G. (2016). Molecular identification of *Echinococcus granulosus* isolates from ruminants in Greece. *Vet. Parasitol.*, *226*, 138-144.
- Romig, T., Deplazes, P., Jenkins, D., Giraudoux, P., Massolo, A., Craig, P. S., Wassermann, M., Takahashi, K. & de la Rue, M. (2017). Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Adv. Parasitol.*, *95*, 213-314.
- Romig, T., Ebi, D. & Wassermann, M. (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Vet. Parasitol.*, *213*, 76-84.
- Rosenzvit, M. C., Camicia, F., Kamenetzky, L., Muzulin, P. M. & Gutierrez, A. M. (2006). Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Int.*, *55*, S63-S67.
- Rosenzvit, M. C., Zhang, L. H., Kamenetzky, L., Canova, S. G., Guarnera, E. A. & McManus, D. P. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitol.*, *118*, 523-530.
- Rostami, S., Shariat Torbaghan, S., Dabiri, S., Babaei, Z., Ali Mohammadi, M., Sharbatkhor, M. & Fasihi Harandi, M. (2015). Genetic characterization of *Echinococcus granulosus* from a large number of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of human isolates in Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *92*, 588-594.
- Saarma, U., Jõgisalu, I., Moks, E., Varcasia, A., Lavikainen, A., Oksanen, A., Simsek, S., Andresiuk, V., Denegri, G., González, L. M., Ferrer, E., Gárate, T., Rinaldi, L. & Maravilla, P. (2009). A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitol.*, *136*, 317-328.

- Sadjjadi, S. M., Mikaeili, F., Karamian, M., Maraghi, S., Sadjjadi, S., Shariat-Torbaghan, S. & Kia, E. B. (2013). Evidence that the *Echinococcus granulosus* G6 genotype has an affinity for the brain in humans. *Int. J. Parasitol.*, *43*, 875–877.
- Sadjjadi, S. M., Sedaghat, F., Hosseini, S. V. & Sarkari, B. (2009). Serum antigen and antibody detection in echinococcosis: application in serodiagnosis of human hydatidosis. *Korean J. Parasitol.*, *47*, 153-157.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, *4*, 406-425.
- Sánchez, E., Cáceres, O., Naquira, C., Miranda, E., Samudio, F. & Fernandes, O. (2012). *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *107*, 275-278.
- Sánchez Thevenet, P., Jensen, O., Drut, R., Cerrone, G. E., Grenóvero, M. S., Alvarez, H. M., Targovnik, H. M. & Basualdo, J. A. (2005). Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior climate. *Vet. Parasitol.*, *133*, 71-77.
- Santivanez, S. J., Gutierrez, A. M., Rosenzvit, M. C., Muzulin, P. M., Rodriguez, M. L., Vasquez, J. C., Rodriguez, S., Gonzalez, A. E., Gilman, R. H., Garcia, H. H. & Peru, C. W. G. (2008). Human hydatid disease in Peru is basically restricted to *Echinococcus granulosus* genotype G1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *79*, 89-92.
- Sapag, L. F. (2011) "Los Veranadores del Alto Neuquén" Historia Social y Desafíos en la Modernidad. Educo, Neuquén.
- Sarkari, B., Sadjjadi, S., Abidi, H., Izadpanah, A., Kazemian, S. & Rafati, A. (2007). Application of western blotting using native antigen B for serodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Iranian J. Parasitol.*, *2*, 7-12.
- Šarkūnas, M., Vienažindienė, Ž., Alvarez Rojas, C. A., Radziulis, K. & Deplazes, P. (2019). Praziquantel treatment of dogs for four consecutive years decreased the transmission of *Echinococcus intermedium* G7 to pigs in villages in Lithuania. *Food Waterborne Parasitol.*, *15*, e00043.
- Savardashtaki, A., Mostafavi-Pour, Z, Arianfar, F. & Sarkari, B. (2019). Comparison of the Utility of Recombinant B8/2 Subunit of the Antigen B, Native Antigen, and a Commercial ELISA Kit in the Diagnosis of Human Cystic Echinococcosis. *Iran Biomed. J.*, *23*, 246–252.
- Scala, A., Garippa, G., Varcasia, V. M., Tranquillo, C. & Genchi, C. (2006). Cystic echinococcosis in slaughtered sheep in Sardinia (Italy). *Vet. Parasitol.*, *135*, 33-38.
- Schantz, P. M., Chai, J., Craig, P. S., Eckert, J., Jenkins, D. J., Macpherson, C. N. L. & Thakur, A. (1995). Epidemiology and control of hydatid disease. En: R. C. A. Thompson & A. J. Lymbery (Eds.), *Echinococcus and Hydatid Disease*. (pp. 233-331). Australia: CAB International.
- Schneider, R., Gollackner, B., Schindl, M., Tucek, G. & Auer, H. (2010). *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *82*, 871-874.
- Schurer, J., Shury, T., Leighton, F. & Jenkins, E. (2013). Surveillance for *Echinococcus canadensis* genotypes in Canadian ungulates. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, *2*, 97-101.

- Scott, J. C., Stefaniak, J., Pawlowski, Z. S. & McManus, D. P. (1997). Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol.*, *114*, 37-43.
- Seimenis, A. (2003). Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Trop.*, *85*, 191-195.
- Shambesh, M. K., Craig, P. S., Gusbi, A. M., Echuish, E. F. & Wen, H. (1995). Immunoblot evaluation of the 100 and 130 kDa antigens in camel hydatid cyst fluid for the serodiagnosis of human cystic echinococcosis in Lybia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *89*, 276-279.
- Sharma, M., Sehgal, R., Fomda, B. A., Malhotra, A. & Malla, N. (2013). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in north Indian patients: identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *7*, e2262.
- Sheperd, J. C., Aitken, A. & McManus, D. P. (1991). A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *44*, 81-90.
- Sherifi, K., Rexhepi, A., Hamidi, A., Behluli, B., Zessin, K. H., Mathis, A. & Deplazes, P. (2011). Detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep-strain", G1) in naturally infected dogs in Kosovo. *Berl. Munch Tierarztl Wochenschr*, *124*, 518-521.
- Shima, A. L., Constantinoiu, C. C., Johnson, L. K. & Skerratt, L. F. (2018). *Echinococcus Granulosus* Infection in Two Free-Ranging Lumholtz's Tree-Kangaroo (*Dendrolagus lumholtzi*) from the Atherton Tablelands, Queensland. *Trop. Med. Infect. Dis.*, *3*, 47.
- Sigurdarson, S. (2010). Dogs and echinococcosis in Iceland. *Acta Vet. Scand.*, *52*, 6.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F.J. & Müller, N. (2017a). Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. *Adv. Parasitol.*, *96*, 59-257.
- Siles-Lucas, M., Sánchez-Ovejero, C., González-Sánchez, M., González, E., Falcón-Pérez, J.M., Boufana, B., Fratini, F., Casulli, A. & Manzano-Román, R. (2017b). Isolation and characterization of exosomes derived from fertile sheep hydatid cysts. *Vet. Parasitol.*, *236*, 22-33.
- Silva-Álvarez, V., Folle, A. M., Ramos, A. L., Kitano, E. S., Iwai, L. K., Corraliza, I., Córscico, B. & Ferreira, A.M. (2016). *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. *Parasit. Vectors*, 9-69.
- Simsek, S. & Cevik, A. (2014). First detection and molecular characterization of *Echinococcus equinus* in a mule in Turkey. *Acta Parasitol.*, *59*, 773-777.
- Simsek, S., Roinioti, E. & Eroksuz, H. (2015). First report of *Echinococcus equinus* in a donkey in Turkey. *Korean J. Parasitol.*, *53*, 731-735.
- Singh, B. B., Sharma, R., Sharma, J. K. & Gill, J. P. S. (2014). Molecular detection of *E. granulosus* sheep strain (G1) infections in naturally infected dogs in Punjab (India). *Helminthologia*, *51*, 269-272.
- Siracusano, A., Delunardo, F., Teggi, A. & Ortona, E. (2012a). Cystic Echinococcosis: Aspects of Immune Response, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Human Host. *Endocr., Metab. Immune Disord. Drug Targets*, *12*, 16-23.

- Siracusano, A., Delunardo, F., Teggi, A. & Ortona, E. (2012b). Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clin. Dev. Immunol.*, 639362.
- Siracusano, A., Teggi, A. & Ortona, E. (2009). Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 474368.
- Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (2019) <https://www.argentina.gob.ar/boletines-epidemiologicos/2019>. Acceso 20 de Octubre de 2019.
- Slais, J. & Vanek, M. (1980). Tissue reactions to spherical and lobular hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786). *Folia Parasitol.*, 27, 135-143.
- Smyth, J. D. (1977). Strain differences in *Echinococcus granulosus*, with special reference to the status of equine hydatidosis in the United Kingdom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 93-100.
- Smyth, J. D. & Heath, D. D. (1970). Pathogenesis of larval cestodes in mammals. *Helminthol. Abstr.*, 39, 1-23.
- Snàbel, V., Altintas, N., D'Amelio, S., Nakao, M., Romig, T., Yolasigmaz, A., Gunes, K., Turk, M., Busi, M., Hüttner, M., Sevcová, D., Ito, A., Altintas, N. & Dubinský, P. (2009). Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol. Res.*, 105, 145-154.
- Soriano, S. V. (2011). Estudio de características evolutivas de *Echinococcus canadensis* genotipo G6 en canes y caprinos. Epidemiología molecular de la echinococcosis en Neuquén, Argentina. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Soriano, S. V., Debiaggi, M. F., Pierangeli, N. B., Pianciola, L. A., Bergagna, H. F. J., Lazzarini, L. E., Mazzeo, M. L. & Basualdo, J.A. (2016). First study about the development of adult *Echinococcus canadensis* G6 genotype of goat origin in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, 228, 6-12.
- Soriano, S. V., Pierangeli, N. B., Pianciola, L., Mazzeo, M., Lazzarini, L. E., Saiz, M. S., Kossman, A. V., Bergagna, H. F., Chartier, K. & Basualdo, J. A. (2010). Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina. *Parasitol. Int.*, 59, 626-628.
- Spickler, A.R., 2011. Echinococcosis. (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>), CFSPH. Iowa, USA.
- Stadelmann, B., Spiliotis, M., Müller, J., Scholl, S., Müller, N., Gottstein, B. & Hemphill, A. (2010). *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved in metacestode growth and parasite-host cell interactions. *Int. J. Parasitol.*, 40, 1563-1574.
- Sun, L., Fu, J. & Zhou, Y. (2017). Metabolism Controls the Balance of Th17/T-Regulatory Cells. *Front. Immunol.*, 8, 1632.
- Swiderski, Z. (1983). *Echinococcus granulosus*: hook-muscle systems and cellular organization of infective oncospheres. *Int. J. Parasitol.*, 13, 289-299.
- Taherkhani, H., Zeyhle, E. & Rogan, M. T. (2007). Antibody responses in human cystic hydatid disease to the laminated layer of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Res.*, 101, 647-652.

- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tajima, F. (1996). The amount of AND polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rates varies among sites. *Genetics*, 143, 1457-1465.
- Tamarozzi, F., Covini, I., Mariconti, M., Narra, R., Tinelli, C., De Silvestri, A., Manzoni, F., Casulli, A., Ito, A, Neumayr, A., & Brunetti, E. (2016). Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Rapid Tests for the Serodiagnosis of Hepatic Cystic Echinococcosis in Humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10, e0004444.
- Tamarozzi, F., Mariconti, M., Covini, I. & Brunetti, E. (2017). Rapid Diagnostic Tests for the Serodiagnosis of Human Cystic Echinococcosis. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 110, 20-30.
- Tamarozzi, F., Vuitton, L., Brunetti, E., Vuitton, D.A. & Koch, S., (2014). Non-surgical and non-chemical attempts to treat echinococcosis: do they work? *Parasite*, 21, 75.
- Tamer, G.S., Dündar, D., Uzuner, H. & Baydemir, C. (2015). Evaluation of immunochromatographic test for the detection of antibodies against Echinococcosis granulosis. *Med. Sci. Monit.*, 21, 1219–1222.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.
- Tappe, D., Kern, P., Frosch, M. & Kern, P. (2010). A hundred years of controversy about the taxonomic status of *Echinococcus* species. *Acta Trop.*, 115, 167- 174.
- Tashani, O. A., Zhang, L. H., Boufana, B., Jegi, A. & McManus, D. P. (2002). Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosis* in the Benghazi area of eastern Libya. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 96, 369-381.
- Thompson, R. C. A. (1986). Biology and systematics of *Echinococcus*. En: R. C. A. Thompson (Ed.), *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. (pp. 5-43). Londres/Reino Unido: Allen and Unwin.
- Thompson, R. C.A. (1995). Biology and sistematics of *Echinococcus*. En: R. C. A. Thompson & A. J. Lymbery (Eds.), *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. (pp. 1-37). Londres/Reino Unido: George Allan and Unwin.
- Thompson, R. C. A. (2001). Echinococcosis. En: S. H. Gillespie, R. D. Pearson (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. (pp. 595-612). Sussex/Reino Unido: Wiley.
- Thompson, R. C. A. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp. Parasitol.*, 119, 439-446.
- Thompson, R. C. A. (2017). Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.*, 95, 65-109.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids. Res.*, 25, 4876-4882.
- Thompson, R. C. A. & Jenkins, D. J. (2014). *Echinococcus* as a model system. *Int. J. Parasitol.*, 44, 865-877.
- Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. (1988).The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.*, 27, 209-258.

- Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. (1990). *Echinococcus*: biology and strain variation. *Int. J. Parasitol.*, 20, 457-470.
- Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. (2001). Aetiology: parasites and life-cycles. En: J. Eckert, M. A. Gemmell, F. X. Meslin, & Z. Pawlowski (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals*. (pp. 1-16). Ginebra/París: WHO/OIE.
- Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.*, 18, 452-457.
- Thompson, R. C. A. & Smyth, J. D. (1975). Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. *Vet. Parasitol.*, 1, 107-127.
- Tigre, W., Deresa, B., Haile, A., Gabriel, S., Victor, B., Pelt, J. V., Devleeschauwer, B., Vercruyse, J. & Dorny, P. (2016). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* s.l. cysts from cattle, camels, goats and pigs in Ethiopia. *Vet. Parasitol.*, 215, 17-21.
- Tobwin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 4350-4354.
- Torgerson, P. R. (2003). Economic effects of echinococcosis. *Acta Trop.*, 85, 113-118.
- Torgerson, P.R. (2013). The emergence of echinococcosis in central Asia. *Parasitol.*, 140, 1667-73.
- Torgerson, P. R., Oguljahan, B., Muminov, A. E., Karaeva, R. R., Kuttubaev, O. T., Aminjanov, M. & Shaikenov, B. (2006). Present situation of cystic echinococcosis in Central Asia. *Parasitol. Int.*, 55, S207-S212.
- 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.
- Trezequet, M. A., Torres, P., Kistermann, J. C., Bernasconi, G., Lacunza, J. & Ramos, M. (2011). En: S.N.d.S.y.C. Alimentaria (Ed.), Sistema de vigilancia epidemiologica de la hidatidosis animal, en establecimientos con bovinos, ovinos o porcinos, por medio de la faena en la republica argentina. SENASA.
- Turceková, L., Snábel, V., D'Amelio, S., Busi, M. & Dubinský, P. (2003). Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop.*, 85, 223-229.
- Tuxun, T., Wang, J. H., Lin, R. Y., Shan, J. Y., Tai, Q. W., Li, T., Zhan, H., Zhao, J. M. & Wen, H. (2012). Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.*, 34, 520-527.
- Umhang, G., Chihai, O. & Boue, F. (2014a). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitol. Res.*, 113, 4371-4376.
- Umhang, G., Richomme, C., Boucher, J. M., Hormaz, V. & Boue, F. (2013). Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. *Parasitol. Res.*, 112, 1809-1812.
- Umhang, G., Richomme, C., Hormaz, V., Boucher, J. M. & Boue, F. (2014b). Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Trop.*, 133, 64-68.

- Urach Monteiro, D., de Azevedo, M. I., Weiblen, C., Correia Ribeiro, T., Emmanoulidis, J., Tonin, A. A., de Avila Botton, S. & de la Rue, M. (2016). *Echinococcus granulosus* sensu strict, *Echinococcus canadensis* (G7), and *Echinococcus ortleppi* in fertile hydatid cysts isolated from cattle in southern Brazil. *Acta Trop.*, *164*, 41-44.
- Utuk, A. E. & Simsek, S. (2013). Molecular characterization of the horse isolate of *Echinococcus granulosus* in Turkey. *J. Helminthol.*, *87*, 305-308.
- Vanek, M. (1980). A morphological study of hydatids of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from pigs. *Fol. Parasitol.*, *27*, 37-46.
- Varcasia, A., Canu, S., Kogkos, A., Pipia, A. P., Scala, A., Garippa, G. & Seimenis, A. (2007). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol. Res.*, *101*, 1135-1139.
- Varcasia, A., Garippa, G., Pipia, A.P., Scala, A., Brianti, E., Giannetto, S., Battelli, G., Poglayen, G. & Micagni, G. (2008). Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol. Res.*, *102*, 815-818.
- Varcasia, A., Canu, S., Lightowers, M.W., Scala, A. & Garippa, G. (2006). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol. Res.*, *98*, 273-277.
- Villalobos, N., Gonzalez, L.M., Morales, J., de Aluja, A. S., Jimenez, M. I., Blanco, M. A., Harrison, L. J., Parkhouse, R. M. & Garate, T. (2007). Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet. Parasitol.*, *147*, 185-189.
- Virginio, V. G., Taroco, L., Ramos, A. L., Ferreira, A. M., Zaha, A., Ferreira, H. B. & Hernández, A. (2007). Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol. Res.*, *100*, 935-942.
- Vola, A., Tamarozzi, F., Noordin, R., Yunus, M. H., Khanbabaie, S., De Silvestri, A., Brunetti, E. & Mariconti, M. (2018). Preliminary assessment of the diagnostic performances of a new rapid diagnostic test for the serodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, *92*, 31-33.
- Vural, G., Baca, A. U., Gauci, C. G., Bagci, O., Gicik, Y. & Lightowers, M. W. (2008). Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet. Parasitol.*, *154*, 347-50.
- Wassermann, M., Aschenborn, O., Aschenborn, J., Mackenstedt, U. & Romig, T. (2015). A sylvatic lifecycle of *Echinococcus equinus* in the Etosha National Park, Namibia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, *4*, 97-103.
- Wassermann, M., Woldeyes, D., Gerbi, B. M., Ebi, D., Zeyhle, E., Mackenstedt, U., Petros, B., Tilahun, G., Kern, P. & Romig, T. (2016). A novel zoonotic genotype related to *Echinococcus granulosus* sensu stricto from southern Ethiopia. *Int. J. Parasitol.*, *46*, 663-668.
- Wang, I. C., Ma, Y. X., Kuo, C. H. & Fan, P. C. (1997). A comparative study on egg hatching methods an oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs. *Int. J. Parasitol.*, *27*, 1311-1314.

- Wang, N., Wang, J., Hu, D., Zhong, X., Jiang, Z., Yang, A., Deng, S., Guo, L., Tsering, D., Wang, S., Gu, X., Peng, X. & Yang, G. (2015). Genetic variability of *Echinococcus granulosus* based on the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Mitochondrial DNA*, 26, 396-401.
- Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D. A., Zhang, W. & McManus, D. P. (2019). Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.*, 32, e00075-18.
- WHO-IWGE, Informal Working Group on Echinococcosis (2003). International classification of ultrasound images in Cystic Echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Trop.*, 85, 253-261.
- WHO-IWGE. (2017). Meeting of the WHO Informal Working Group on Echinococcosis (WHO-IWGE): WHO Headquarters, Geneva, Switzerland. p. 27.
- Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P. M., Craig, P. S. & Ito, A. (2005). *Echinococcus shiquicus* sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.*, 35, 693–701.
- Yanagida, T., Mohammadzadeh, T., Kamhawi, S., Nakao, M., Sadjjadi, S. M., Hijjawi, N., Abdel-Hafez, S. K., Sako, Y., Okamoto, M. & Ito, A. (2012). Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in the Middle East. *Parasitol. Int.*, 61, 599–603.
- Yang, Y. R., Liu, T., Bai, X., Boufana, B., Craig, P. S., Nakao, M., Ito, A., Zhang, J. Z., Giraudoux, P. & McManus, D. P. (2009). Natural infection of the ground squirrel (*Spermophilus* spp.) with *Echinococcus granulosus* in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3, e518.
- Zait, H., Boulahbel, M., Normand, A. C., Zait, F., Achir, I., Guerchani, M. K., Chaouche, H., Ladjadj, Y. & Hamrioui, B. (2014). Parasitological study of 78 cases of human cystic echinococcosis collected between 2005 to 2012 in Mustapha hospital center of Algiers. *Pathol. Biol.*, 62, 369-376.
- Zait, H. & Hamrioui, B. (2019). Human cystic echinococcosis: Serological diagnosis by indirect hemagglutination test, enzyme-linked immunosorbent assay, immunoelectrophoresis, and immunoblotting in surgically confirmed patients versus cases diagnosed by imaging techniques. *Med. Mal. Infect.*, <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.10.001>
- Zanini, F., Laferrara, M., Bitsch M., Perez, H. & Elissondo, M. C. (2006). Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of the patagonian grey fox (*Pseudalopex griseus*) in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina. *Vet. Parasitol.*, 136, 329-334.
- Zanini, F., Suárez, C., Pérez, H. & Elissondo, M. C. (2009). Epidemiological surveillance of cystic echinococcosis in rural population of Tierra del Fuego, Argentina, 1997-2006. *Parasitol. Int.*, 58, 69-71.
- Zarzosa, M.P., Orduña, D. A., Gutiérrez, P., Alonso, P., Cuervo, M., Prado, A., Bratos, M. A., García-Yuste, M., Ramos, G. & Rodríguez Torres, A. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 35, 255-262.
- Zhang, W., Li, J., Jones, M., Zhang, Z., Zhao, L., Blair, D. & McManus, D. P. (2010). The *Echinococcus granulosus* Antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 4, e784.

- Zhang, W., Li, J & McManus, D. P. (2003). Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 18-36.
- Zhang, W. & McManus, D. P. (2006). Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 47, 24-41.
- Zhang, W., Wen, H., Li, J., Lin, R. & McManus, D. P. (2012). Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clin. Dev. Immunol.*, e101895.
- Zhang, T., Yang, D., Zeng, Z., Zhao, W., Liu, A., Piao, D., Jiang, T., Cao, J., Shen, Y., Liu, H. & Zhang, W. (2014). Genetic characterization of human-derived hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* sensu lato in Heilongjiang Province and the first report of G7 genotype of *E. canadensis* in humans in China. *PLoS One*, 9: e109059.
- Zheng, J., Du, F. & Wang, D. (2014). The experience of 526 patients with hepatic echinococcosis in Tibet. *J. Hepatobil. Surg.*, 22, 459-461.
- Ziadinov, I., Mathis, A., Trachsel, D., Rysmukhambetova, A., Abdyjaparov, T. A., Kuttubaev, O. T., Deplazes, P. & Torgerson, P. R. (2008). Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models. *Int. J. Parasitol.*, 38, 1179-1190.

ARTÍCULO DE RESPALDO

Genetic characterization of human hydatid cysts shows coinfection by *Echinococcus canadensis* G7 and *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1 in Argentina

María Florencia Debiaggi^{1,2} · Silvia Viviana Soriano¹ · Nora Beatriz Pierangeli¹ · Lorena Evelina Lazzarini¹ · Luis Alfredo Pianciola³ · Melina Leonor Mazzeo³ · Sergio Moguillansky⁴ · Juan Angel Basualdo Farjat⁵

Received: 24 April 2017 / Accepted: 5 July 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Human cystic echinococcosis caused by the larval stage of *Echinococcus granulosus sensu lato* (*s.l.*) is a highly endemic disease in the province of Neuquén, Patagonia, Argentina. Human infections with *E. granulosus sensu stricto* (*s.s.*) G1 and *Echinococcus canadensis* G6 were reported in Neuquén in previous studies, whereas four genotypes were identified in livestock: G1, G3, G6, and G7. The aim of this study was to identify the genotypes of *E. granulosus s.l.* isolates from humans of Neuquén province, Patagonia, Argentina, through the 2005–2014 period. Twenty six hydatid cysts were obtained from 21 patients. The most frequent locations were the liver and lungs. Single cysts were observed in 81.0% of patients, and combined infection of liver and lungs was detected in 9.5% of cases. Partial sequencing of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) and NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) genes identified the presence

of *E. granulosus s.s.* G1 ($n = 11$; 42.3%) including three different partial sequences; *E. canadensis* G6 ($n = 14$; 53.8%) and *E. canadensis* G7 ($n = 1$; 3.9%). Coinfection with G1 and G7 genotypes was detected in one patient who harbored three liver cysts. Most of the liver cysts corresponded to G1 and G6 genotypes. This study presents the first report in the Americas of a human infection with *E. canadensis* G7 and the second worldwide report of a coinfection with two different species and genotypes of *E. granulosus s.l.* in humans. The molecular diversity of this parasite should be considered to redesign or improve the control program strategies in endemic regions.

Keywords *Echinococcus canadensis* · *Echinococcus granulosus* · G7 genotype · Coinfection · Human echinococcosis

Introduction

Cystic echinococcosis (CE) caused by the larval stage of the tapeworm *Echinococcus granulosus sensu lato* (*E. granulosus s.l.*), produces significant economic losses and health problems in both rural and urban population (Eckert et al. 2001; Budke et al. 2006). CE is an important worldwide zoonotic disease that affects more than 100 countries, particularly affecting pastoral and poor rural communities (Alvarez Rojas et al. 2014). In South America, the disease is endemic or hyperendemic in Argentina, Uruguay, Chile, Southern Brazil, and mountain regions of Perú and Bolivia (Cucher et al. 2016). Neuquén is one of the provinces with higher hydatid disease endemicity in Argentina, despite the fact that provincial sanitary authorities carry out a control program of CE since 1970. The mean annual incidence (MAI) of

✉ María Florencia Debiaggi
fdebiaggi@yahoo.com

¹ Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Neuquén, Argentina

³ Laboratorio Central, Subsecretaría de Salud de Neuquén, Neuquén, Argentina

⁴ Cátedra de Anatomía e Imágenes Normales, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina

⁵ Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP) sede Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

human CE in Neuquén, based on official records of confirmed cases, was 24.4 per 100,000 inhabitants and 9.7 per 100,000 in children aged 0–14 years between 1995 and 2004 (Pierangeli et al. 2007). Fifty-nine new cases of human CE were confirmed in the province in 2015 (MAI: 8.9 per 100,000) (National System of Health Surveillance 2017).

Humans become infected with *E. granulosus s.l.* by the ingestion of eggs released from infected dogs or other canids through direct contact with the animals or consumption of water and/or vegetables contaminated with infected canid feces (Thompson and McManus 2001). After ingestion, eggs hatch, and each onchosphere can develop an unilocular hydatid cyst, located in different organs. The liver is the most common involved organ followed by the lungs, but the cysts can develop less frequently in other locations like the kidneys, spleen, heart, bone and brain (Moro and Schantz 2009).

E. granulosus s.l. is considered a species complex with a high genetic and phenotypic variation, and its taxonomy is still controversial (Romig et al. 2015). In this work, we followed the nomenclature proposed by Nakao et al. (2013) for practical reasons. To date ten different genotypes (G1–G10) have been described within this complex using molecular tools, comprising: *E. granulosus sensu stricto (s.s.)* (genotypes G1–G3); *Echinococcus equinus* (G4); *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus canadensis* (G6–G10) (Bowles et al. 1992; Lavikainen et al. 2003; Nakao et al. 2013). Recently, the “lion strain” (*E. felidis*) has been proposed as another valid species, as it is evidently phylogenetically sister to *E. granulosus s.s.* (Hüttner et al. 2008).

Up to the present, four genotypes have been found in human CE isolates in Argentina: G1, G2, G5, and G6, as well as six genotypes in livestock: G1, G2, G3, G5, G6, and G7 (Cucher et al. 2016; Avila et al. 2017). Among the G1 isolates of Argentina, eight different partial sequences have been identified: the original G1 sequence described by Bowles et al. (1992), which we named G1nqnA in this work, and seven microvariants of this genotype (Kamenetzky et al. 2002; Soriano et al. 2010, 2015).

Human infections with *E. granulosus s.s.* G1 and *E. canadensis* G6 were reported in Neuquén in previous studies, whereas four genotypes were identified in livestock: G1 (goats and sheep), G3 (sheep), G6 (goats and cattle), and G7 (pigs) (Kamenetzky et al. 2002; Guarnera et al. 2004; Soriano et al. 2010, 2015). The diversity of genotypes in livestock is greater than that found to date in humans in Neuquén, suggesting that more genotypes could also cause human CE in this region. The aim of this study was to identify the genotypes of *E. granulosus s.l.* isolates from humans of Neuquén province, Patagonia, Argentina through the 2005–2014 period.

Materials and methods

A prospective, observational, and descriptive study was conducted between September 2005 and March 2014 in the province of Neuquén. This province is located in the north of the Argentine Patagonia region, comprising an area of 94,078 km² extending from 36° 39' to 41° 01' S latitude and 68° 00' to 71° 58' W longitude. The total population was 565,242 inhabitants in 2010. According to the last official records, 684,777 goats; 164,161 sheep; 186,873 cattle; and 16,927 pigs were reported in the province in 2008 (Provincial Direction of Statistics and Census 2017). The main economic activity in rural areas is raising livestock for subsistence (goats, sheep, and cattle), under a transhumant model of production. This fact leads to a close contact among humans, livestock, and shepherd dogs. Pigs are mostly raised in periurban areas, near to the largest cities.

Samples of hydatid cysts were collected from clinically and/or imaging diagnosed CE patients who underwent surgery for the disease in different public and private hospitals from Neuquén. The samples were pieces of germinal layer and/or hydatid fluid obtained from each cyst, by the surgeons, immediately after the surgery. CE materials were sent refrigerated to our laboratory in a lapse of no more than 4 h. Data about age and gender of patients as well as cysts location were recorded. Cysts were not pooled as each cyst was considered a single sample. The protoscoleces (PSC) or pieces of germinal layer were preserved in 70% ethanol at 4 °C.

Genomic DNA was extracted from each sample using the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was then stored at –20 °C until PCR amplification. For molecular identification of *E. granulosus s.l.* genotypes, a 450 bp fragment of the *cox1* gene was amplified from each isolate using previously published primers (Bowles et al. 1992). To confirm the differentiation between the G6 and G7 genotypes, a 500 bp fragment of the *nad1* gene was also amplified from each *E. canadensis* isolate using published primer sets (Bowles and McManus 1993). PCR conditions were the same as described by Soriano et al. (2010). PCR products were purified by ethanol precipitation and sequenced in both directions. Sequences were aligned and compared with reference sequences of *E. granulosus s.l.* downloaded from GenBank (GenBank accession numbers: U50464 (G1), M84662 (G2), M84663 (G3), M84664 (G4), M84665 (G5), M84666 (G6), M84667 (G7), AB235848 (G8), and AF525457 (G10), using ClustalX v2.1 and Bioedit v7.2.5 softwares for Windows.

Results and discussion

Twenty-six hydatid cysts were obtained from 21 patients aged 4 to 80 years, and 13.6% of the patients were children

between 0 and 14 years. Male accounted for 12/21 of cases (57.1%). The most frequent location was the liver, followed by the lungs (Table 1). Cyst location analysis showed that in 90.5% of cases, only one organ was affected. This result is in accordance with the 95.8% described previously in 938 patients of Neuquén between 1995 and 2004 (Pierangeli et al. 2007). Simultaneous infection in the liver and lungs was detected in 9.5% of patients (including children and adults). This finding is similar to the proportion of 10.0% reported in a study about CE patients in Mar del Plata, Argentina (ages ranged from 15 to 84 years) but higher than the 1.8% of combined liver and lung involvement described previously in patients from 7 to 93 years in Neuquén (Dopchiz et al. 2007; Pierangeli et al. 2007). In contrast, the 19.3% of combined liver and lung involvement was described in patients from 2 to 86 years in Turkey (Kurul et al. 2002).

Hepatic cysts were more frequent than pulmonary cysts at a ratio of 2.5:1, in accordance with reports from other authors based on surgical and/or symptomatic cases (Larrieu and Frider 2001; Djuricic et al. 2010). The factors that determine the final anatomic location of cysts are still unknown; however, the liver is the organ most frequently infected because the oncospheres penetrate the intestinal wall and tend to disseminate to the liver via the portal vein. Variation in cyst location frequencies observed in diverse studies throughout the world could be due to infection with different genotypes of *E. granulosus s.l.*, which could have an affinity for different organs (Pierangeli et al. 2007).

Sequence analysis revealed the presence of two species and three genotypes of *E. granulosus s.l.* in Neuquén human isolates: *E. granulosus s.s.* G1 ($n = 11$; 42.3%), *E. canadensis* G6 ($n = 14$; 53.8%), and *E. canadensis* G7 ($n = 1$; 3.9%). Among the G1 isolates, we identified three different partial sequences including the original G1 sequence described by Bowles et al. (1992) which we named G1nqnA, and two microvariants of this sequence: G1nqnC (shows a change of C x T in position 73 compared with the reference sequence) and G1nqnD

(shows a change of G x A in position 136 compared with the reference sequence). The sequence of the G1nqnC microvariant showed 100% identity with a sequence previously described in humans in Algeria, in cattle in Brazil, and in dogs in Neuquén, whereas the G1nqnD microvariant was detected, to date, only in Neuquén (Soriano et al. 2010; Laurimäe et al. 2016; Zait et al. 2016; authors' unpublished data). The original G1 sequence (G1nqnA) was already found in Neuquén in sheep, cattle, and dogs isolates; G1nqnC microvariant was previously detected in cattle and in one dog of the study area whereas the presence of G1nqnD microvariant was also characterized in sheep and cattle isolates from Neuquén (Kamenetzky et al. 2002; Soriano et al. 2010; authors' unpublished data). The fact that the two G1 microvariants identified in humans were also present in other local intermediate hosts as well as in dogs suggests that they are not casual findings. On the contrary, active lifecycles of each of them seems to coexist in sympatry. The GenBank accession numbers for the nucleotide sequences characterized in this study as well as the distribution of genotypes in relation to the anatomic location of cysts is shown in Table 2. Our results confirm previous findings of Kamenetzky et al. (2002) about the presence of *E. granulosus s.l.* G1 and G6 in human isolates but also demonstrate that other species/genotypes/microvariants are responsible of local human cystic echinococcosis.

E. granulosus s.s. G1 is the most frequent genotype associated with human CE worldwide, being responsible for 72.9% of the global burden of the disease, whereas G6 genotype is considered poorly infective to human accounting for 12.2% of human cases (Alvarez Rojas et al. 2014; Cucher et al. 2016). However, *E. canadensis* G6 was the major causative agent of CE in Neuquén patients (53.8%), followed by *E. granulosus s.s.* G1 and *E. canadensis* G7 in the present work. There are reports of human infection with *E. canadensis* G6 in other provinces of Argentina and other South American countries

Table 1 Frequency of cyst location in confirmed human cystic echinococcosis cases from Neuquén between 2005 and 2014

Location	No. of cases	% of total
Liver	11	52.4
Lungs	3	14.2
Liver + lungs	2	9.5
Brain	1	4.8
Spleen	1	4.8
Kidney	1	4.8
Peritoneum	1	4.8
Retroperitoneum	1	4.8
Total	21	100.0

Table 2 Distribution of genotypes of *E. granulosus sensu lato* according to anatomic location

Location	G1nqnA ^a	G1nqnC ^a	G1nqnD ^a	G6 ^{a,b}	G7 ^{a,b}	Total
Liver	4	1	2	7	1	15
Lung	2	–	–	4	–	6
Brain	–	–	–	1	–	1
Peritoneum	1	–	–	–	–	1
Retroperitoneum	1	–	–	–	–	1
Kidney	–	–	–	1	–	1
Spleen	–	–	–	1	–	1
Total	8	1	2	14	1	26

^a Accession number for *cox1*: JN176931 (G1nqnA), KT719395 (G1nqnC), JN176930 (G1nqnD), JN176934 (G6), and JN176935 (G7)

^b Accession number for *nad1*: KT749868 (G6) and KT868832 (G7)

(Chile and Perú) that are close to Argentina, but in all these cases *E. granulosus s.s.* G1 is still the most frequent genotype involved in human CE (Cucher et al. 2016; Avila et al. 2017). The predominance of *E. canadensis* G6 in humans could be related to particular socio-economic and cultural characteristics that differentiate Neuquén from other regions. Most rural population in Neuquén raise goats under a model of production with great migrating movements every year (transhumance), from small areas near to their homes in the winter to fertile lands in the mountains in the summer. Transhumance involves a close contact between the families, livestock, and shepherd dogs, and this fact could increase the risk of human infection by *E. canadensis* G6, as goats are the major reservoir of this species/genotype in Neuquén (Soriano et al. 2010). More studies concerning human CE molecular epidemiology in Neuquén, involving a higher number of cases, are needed to confirm or refute this finding.

The sequence analysis of PCR products allowed us to describe for the first time a case of human infection with *E. canadensis* G7 in Argentina and in the Americas, which confirms the role of this genotype as a causative agent of human infection. The sequence of the G7 genotype showed complete *cox1* and *nad1* identity with published sequences described in pigs of Neuquén (Soriano et al. 2010), in pigs and cattle of other provinces of Argentina and other countries (Kamenetzky et al. 2002; Beato et al. 2013; Konyaev et al. 2013; Monteiro et al. 2014), and in humans of China (Zhang et al. 2014). To date, there are no reports of human infection with *E. canadensis* G7 in the Americas (Alvarez Rojas et al. 2014; Cucher et al. 2016). Human cases due to genotype G7 were reported in central and eastern European countries, Asia, and in South Africa, associated with pig transmission (Dybicz et al. 2013; Alvarez Rojas et al. 2014; Zhang et al. 2014). The role of *E. canadensis* G7 as causative agent of human CE is generally underestimated. Schneider et al. (2010) suggested that the reasons for this underestimation could be that G7 metacestodes tend to be small, located in the liver, and may be asymptomatic for years or probably never detected. Our results seem to be in accordance with that suggestion, as the only *E. canadensis* G7 cyst detection was located in the liver, and the cyst's diameter was estimated by the surgeon as approximately 0.5 cm.

Coinfection with *E. granulosus s.s.* G1nqnD and *E. canadensis* G7 was detected in one patient who harbored three hydatid cysts in the liver. The patient was a woman of 43 years old from Andacollo, a small rural village in the north of Neuquén. This patient underwent two surgeries. In the first one, two cysts were removed and were genetically characterized as G1nqnD and G7, respectively. The second surgery was conducted 3 months later, to remove another hydatid cyst from the liver that was also characterized as G1nqnD microvariant.

There are few reports of mixed *E. granulosus s.l.* infections in intermediate hosts in the world. Coinfection has been reported in France and in the Republic of Moldova, where two different genotypes of *E. granulosus s.s.* were identified in the lungs and liver of sheep and cattle (Umhang et al. 2013, 2014). The presence of mixed infections could be the result of successive infections of the intermediate host, or by a single infection due to a definitive host harboring simultaneously adult worms of different species of *E. granulosus s.l.* (Umhang et al. 2014). Recently, Oudni-M'rad et al. (2016) reported for the first time a coinfection in humans, involving *E. granulosus s.s.* G1 and *E. canadensis* G6 in a child from Tunisia. Coincidentally, in the present study, we were able to describe the first case of human mixed infection with two *E. granulosus s.l.* species: *E. granulosus s.s.* G1 (microvariant G1nqnD) and *E. canadensis* G7 in the Americas. The patient was from Sanitary Area III, an endemic rural area of Neuquén province with a MAI of 78.4 per 100,000 inhabitants (Pierangeli et al. 2007). These results demonstrate that human coinfection is a fact that should be taken into account, especially in endemic regions where different species and genotypes of *E. granulosus s.l.* are present with sympatric lifecycles.

The analysis of distribution of genotypes in relation to location of cysts showed that most of the liver cysts corresponded to *E. granulosus s.s.* G1 and *E. canadensis* G6 genotype (Table 2). Although we observed that most of G6 genotype cysts were located in the liver (50%), this genotype also infected other organs like the lungs, kidney, spleen, and brain. Interestingly, the location of *E. canadensis* G6 cysts in humans seems to be different from the location previously observed in goats from Neuquén, in which a clear tropism to the lungs has been demonstrated (Soriano et al. 2010). Despite the fact that *E. canadensis* G6 was the causative agent of the only brain cyst detected in this study, our results are not enough to confirm the hypothesis of Sadjjadi et al. (2013), who suggested that genotype G6 seems to have a higher affinity for the human brain, as only 7% (1/14) of G6 genotype cysts corresponded to this location. More studies of molecular characterization of *E. granulosus s.l.* metacestodes from different locations are needed to assess if the different species/genotypes are associated with preferential locations in humans.

The occurrence of cases in children indicates that there is an active disease transmission, although an echinococcosis control program has been carried out in Neuquén province for several decades. Moreover, our results showed that a diversity of species and genotypes of *E. granulosus s.l.* can infect humans in Neuquén. Molecular diversity of *E. granulosus s.l.* can affect life cycle patterns such as host specificity, growth and development rates in the definitive hosts, infectivity to intermediate hosts, pathogenicity, and antigenicity (Soriano et al. 2016; Avila et al. 2017). Therefore,

the diversity of species and microvariants found in different hosts including humans in Neuquén, could have important consequences in immunological diagnosis, response to therapy and vaccines, as well as in the control and surveillance of CE. For instance, the control program in Neuquén is based on periodic anthelmintic treatment of dogs every 6 weeks, taking into account the prepatent period of *E. granulosus* s.s. G1. However, in dogs infected with *E. canadensis* G6 and G7, the prepatent periods are shorter (about 40 and 35 days, respectively) (Soriano et al. 2016). The increase of knowledge of the molecular epidemiology and the diversity of *E. granulosus* s.l. could contribute to improve or redesign the control program in Neuquén.

Further studies concerning human CE molecular epidemiology are needed to assess the possible associations between the different species/genotypes/microvariants and biological aspects of human infection like clinical and immunological features of the disease, tropism, biochemistry, and fertility and viability of cysts, among others.

Acknowledgements The authors are grateful with the surgery department of public and private hospitals of Neuquén province.

Compliance with ethical standards

Funding This study was funded by grant 04/N018 from the Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Comahue.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This research study was approved by the Science and Technology Secretary of the National University of Comahue according to Permission No. 0991/05 Record No. 02327/05 dated on September 27, 2005. All adult subjects and parents/tutors of the children gave their written informed consent for surgery. The information of patients has been anonymised so that they cannot be identified.

References

- Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW (2014) *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans—review of current knowledge. *Int J Parasitol* 44:9–18
- Avila HG, Santos GB, Cucher MA, Macchiaroli N, Pérez MG, Baldi G, Jensen O, Pérez V, López R, Negro P, Scialfa E, Zaha A, Ferreira HB, Rosenzvit M, Kamenetzky L (2017) Implementation of new tools in molecular epidemiology studies of *Echinococcus granulosus* sensu lato in South America. *Parasitol Int* 66:250–257
- Beato S, Parreira R, Roque C, Gonçalves M, Silva L, Maurelli MP, Cringoli G, Grácio MA (2013) *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet Parasitol* 198:235–239
- Bowles J, McManus DP (1993) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23:969–972
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54:165–174
- Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12:296–303
- Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi G, Camicia F, Prada L, Maldonado L, Avila HG, Fox G, Gutiérrez A, Negro P, López R, Jensen O, Rosenzvit M, Kamenetzky L (2016) Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus* sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Tropical Med Int Health* 21:166–175
- Djuricic SM, Grebeldinger S, Kafka DI, Djan I, Vukadin M, Vasiljevic ZM (2010) Cystic echinococcosis in children—the seventeen-year experience of two large medical centers in Serbia. *Parasitol Int* 59:257–261
- Dopchiz MC, Elissondo MC, Rossin MA, Denegri G (2007) Hydatidosis cases in one of Mar del Plata hospitals, Buenos Aires, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:635–639
- Dybicz M, Gierczak A, Dąbrowska J, Rdzanek Ł, Michałowicz B (2013) Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland. *Parasitol Int* 62:364–367
- Eckert J, Schantz PM, Gasser RB, Torgerson PR, Bessonov AS, Movessian SO, Thakur A, Grim F, Nikogossian MA (2001) Geographic distribution and prevalence. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski Z (eds) WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals. WHO/OIE, Paris, pp 100–142
- Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, García G, Gutiérrez A (2004) Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop* 92:153–159
- Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A (2008) Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 38:861–868
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Rosenzvit MC (2002) Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol* 2:129–136
- Konyaev SV, Yanagida T, Nakao M, Ingovatova GM, Shoykhet YN, Bondarev AY, Odnokurtsev VA, Loskutova KS, Lukmanova GI, Dokuchaev NE, Spiridonov S, Alshinecky MV, Sivkova TN, Andreyanov ON, Abramov SA, Krivopalov AV, Karpenko SV, Lopatina NV, Dupal TA, Sako Y, Ito A (2013) Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. *Parasitology* 140:1637–1647
- Kurul IC, Topcu S, Altinok T, Yazucu U, Tastepe I, Kaya S, Cetin G (2002) One-stage operation for hydatid disease of lung and liver: principles of treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124:1212–1215
- Larrieu EJ, Frider B (2001) Human cystic echinococcosis: contributions to the natural history of the disease. *Am J Trop Med Parasitol* 95:679–687
- Laurimäe T, Kinkar L, Andresiuk V, Haag KL, Ponce-Gordo F, Acosta-Jamett G, Garate T, González LM, Saarma U (2016) Genetic diversity and phylogeography of highly zoonotic *Echinococcus granulosus* genotype G1 in the Americas (Argentina, Brazil, Chile and Mexico) based on 8279bp of mtDNA. *Infect Genet Evol* 45:290–296
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127:207–215
- Monteiro DU, Botton SA, Tonin AA, Azevedo MI, Graichen DA, Noal CB, de la Rue ML (2014) *Echinococcus canadensis* (G7) and

- Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) in swine of southern Brazil. *Vet Parasitol* 202:335–338
- Moro P, Schantz PM (2009) Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13: 125–133
- Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A (2013) Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol* 43:1017–1029
- National System of Health Surveillance (2017) <http://www.msal.gob.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>. Accessed 15 April 2017
- Oudni-M'rad M, M'rad S, Ksia A, Lamiri R, Mekki M, Nouri A, Mezhoud H, Babba H (2016) First molecular evidence of the simultaneous human infection with two species of *Echinococcus granulosus* sensu lato: *Echinococcus granulosus* sensu stricto and *Echinococcus canadensis*. *Parasitol Res* 115:1065–1069
- Pierangeli NB, Soriano SV, Roccia I, Giménez J, Lazzarini LE, Grenóvero MS, Menestrina C, Basualdo JA (2007) Heterogeneous distribution of human cystic echinococcosis after a long-term control program in Neuquén, Patagonia Argentina. *Parasitol Int* 56:149–155
- Provincial Direction of Statistic and Census (2017) Neuquén Province http://www.estadisticaneuquen.gob.ar/index.php?sec=aplicacion_neuquen_numeros. Accessed 15 April 2017
- Romig T, Ebi D, Wassermann M (2015) Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* sensu lato. *Vet Parasitol* 213:76–84
- Sadjjadi SM, Mikaeili F, Karamian M, Maraghi S, Sadjjadi S, Shariat-Torbaghan S, Kia EB (2013) Evidence that the *Echinococcus granulosus* G6 genotype has an affinity for the brain in humans. *Int J Parasitol* 43:875–877
- Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H (2010) *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am J Trop Med Hyg* 82:871–874
- Soriano SV, Pierangeli NB, Pianciola LA, Mazzeo M, Lazzarini LE, Saiz MS, Kossman AV, Bergagna HFJ, Chartier K, Basualdo JA (2010) Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina. *Parasitol Int* 59:626–628
- Soriano SV, Pierangeli NB, Pianciola LA, Mazzeo M, Lazzarini LE, Debiaggi MF, Bergagna HF, Basualdo JA (2015) The optimum cut-off value to differentiate *Echinococcus granulosus* sensu stricto from other species of *E. granulosus* sensu lato using larval rostellar hook morphometry. *J Helminthol* 89:1–8
- Soriano SV, Debiaggi MF, Pierangeli NB, Pianciola LA, Bergagna HF, Lazzarini LE, Mazzeo M, Basualdo JA (2016) First study about the development of adult *Echinococcus canadensis* G6 genotype of goat origin in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol* 228:6–12
- Thompson RCA, McManus DP (2001) Aetiology: parasites and life-cycles. In: Eckert J, Gemmell A, Meslin FX, Pawlowski Z (eds) WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals. WHO/OIE, Paris, pp 1–16
- Umhang G, Richomme C, Boucher JM, Hormaz V, Boué F (2013) Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. *Parasitol Res* 112:1809–1812
- Umhang G, Chihai O, Boué F (2014) Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitol Res* 113:4371–4376
- Zait H, Kouidri M, Grenouillet FE, Umhang G, Millon L, Hamrioui B, Grenouillet F (2016) Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* sensu stricto and *Echinococcus canadensis* in humans and livestock from Algeria. *Parasitol Res* 115:2423–2431
- Zhang T, Yang D, Zeng Z, Zhao W, Liu A, Piao D, Jiang T, Cao J, Shen Y, Liu H, Zhang W (2014) Genetic characterization of human-derived hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* sensu lato in Heilongjiang Province and the first report of G7 genotype of *E. canadensis* in humans in China. *PLoS One* 9:1–7 e109059