

REVISTA PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Vol. 65 / Nº 3 - DICIEMBRE 2016

Versión: On-Line: 0719-6326

Artículos originales

- Epidemiología molecular de *Echinococcus granulosus* en las Américas: implicaciones para el control y diagnóstico
- Hidatidosis: un problema no resuelto en Chile
- Equinococosis quística: una década de egresos hospitalarios. Resultados preliminares.
- Dipilidiosis humana en concepción. Reporte de caso y revisión de claves diagnósticas en el laboratorio
- Supervivencia de *Giardia duodenalis* en agua de mar, de río y subterránea a temperaturas ambientales
- Human toxocarosis: in vitro production of soluble mediators against *Toxocara canis* infection
- *Mepraia spinolai* (Porter) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): morfología e índice de infección en su área de distribución.
- From epidemic outbreaks to pandemics: the critical time of percolation



REVISTA

PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Volumen 65 N° 3-2016

ISSN: 0719-6326



REVISTA

PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA

Editor

Mauricio Canals (Chile)

Editores Asociados

Héctor Alcaino (Chile)
Werner Apt (Chile)
Pedro E. Cattán (Chile)
Fernando Fredes (Chile)
Catalina Muñoz (Chile)
Marisa Torres (Chile)
Inés Zulantay (Chile)
Mario George-Nascimento (Chile)

Editores Adjuntos

Guillermo Denegri (Argentina)	Arturo Ferreira (Chile)
Benjamín Cimerman (Brasil)	Ana Fliser (México)
David Botero (Colombia)	Luis Gil (Chile)
Rodrigo Zeledón (Costa Rica)	David Gorla (Argentina)
Jorge Sapunar (Chile)	Alejandro Llanos-Cueto (Perú)
Ramón Lazo (Ecuador)	Santiago Mas-Coma (España)
Raúl Romero (México)	Patricia Muñoz (Chile)
César Náquira (Perú)	Isabel Noemí (Chile)
Oswaldo Ceruzzi (Uruguay)	Chris Schofield (Inglaterra)
George Hillyer (Puerto Rico)	Aldo Solari (Chile)
Alejandro Schijman (Argentina)	Patricio Torres (Chile)
Anne Petavy (Francia)	Daniel González (Chile)
Michel Tivarenck (Francia)	Thomas Weitzel (Alemania)
Naftale Kats (Brasil)	Michael Miles (Alemania)
Ives Carlier (Bélgica)	Claudio Lazzari (Argentina)
Paulo Coelho (Brasil)	Felipe Guhl (Colombia)
Telmo Fernández (Ecuador)	Liliana Semenas (Argentina)

Secretarias

Rosa Ávila
Lucía Canals

Editorial

Dimensionando el parasitismo

Un parásito (sensu stricto) es un organismo que exhibe una diversa, pero obligatoria dependencia de otro organismo, su hospedero, el cual se ve afectado en su sobrevivencia y/o fecundidad (Grenfell & Dobson 1995). Los parásitos, al afectar estos dos parámetros, los más importantes del régimen demográfico de una población, reducen la adecuación biológica de su hospedero. Los parásitos pueden afectar: i) la tasa de crecimiento de los hospederos, ii) la direccionalidad del flujo de energía, consumiendo parte de ella, iii) la tasa de competencia y depredación, iv) la composición de especies de la comunidad, y v) la biodiversidad en general.

Dimensionar la importancia y la cantidad de parásitos es una empresa difícil, pero hay algunos números que nos pueden ayudar. ¿Cuánto pesan los parásitos en un ecosistema? Hay algunas estimaciones que proponen que en un humedal salino de 70 ha el total de parásitos en los vertebrados e invertebrados alcanzaría entre 21 y 30 toneladas, esto es, la biomasa equivalente a 7 a 10 elefantes (Kuris, en Hudson 2005). Hay estimaciones que proponen que entre el 40% y 50% de las especies existentes son parásitas. (Price 1980, Toft 1986, Dobson et al. 2008). Hay Phyla en que todas sus especies son parásitas como Opalinata, Mesozoa y Pentastomida. Más del 80% de los gusanos planos (Platyhelminthes) y cerca del 50% de las especies de Arthropoda son parásitos (Dobson et al. 2008). Si sólo consideramos la riqueza de parásitos de vertebrados se estiman aproximadamente 77.000 especies y si nos concentramos sólo en los Nemátodos podemos observar que hay 0,48 especies de parásitos por hospedero en los Condrictios, 1,5 en los peces óseos, 2,8 en los anfibios, 2,2 en los reptiles, 3,3 en las aves y 3,9 en los mamíferos. Se imaginan la magnitud del parasitismo si incluimos las especies de Protozoos, Bacteria y Virus?. Sin lugar a dudas, el parasitismo es una estrategia de vida favorecida por la evolución.

Mauricio Canals Lambarri (M.D., PhD.)
Editor
Parasitología Latinoamericana

Epidemiología molecular de *Echinococcus granulosus* en las Américas: implicaciones para el control y diagnóstico

ALVAREZ ROJAS C.A.

**Centre for Animal Biothecnology, The University of Melbourne
Parkville, Vic 3010, Australia**

Correspondencia:
Cristián Alvarez Rojas
alvarezc@unimelb.edu.au
cristianalvarezrojas@yahoo.com

Summary

The parasite *E. granulosus sensu lato* comprises the group of related parasites responsible for the disease cystic echinococcosis affecting humans and animals. It is well known that the parasite shows great degree of variability, this has allowed the classification of this parasite in strains, genotypes and haplotypes which have been grouped in different proposed species. The investigation of this variability in relationship with diagnostic and control of the parasite is vital to improve control programmes and for a better understanding of the biology of the parasite. The endemic area in the American continent include mainly countries in South America (Brazil, Chile, Peru, Uruguay and Argentina) although it is well known that the parasite is also transmitted in Mexico. There is a need to increase the efforts to improve the knowledge of the molecular epidemiology of this parasite in all the endemic area especially in South America. And to link this knowledge with the control initiatives undertaken in these countries, specially related with vaccination of intermediate hosts and diagnostic of human disease. In this regard it is also important to increase the collaboration between scientist of the endemic countries aiming to share knowledge and resources for a common aim of fighting this neglected parasite.

Introducción

El parásito *Echinococcus granulosus*, así como otros parásitos del género *Echinococcus*, se encuentra en su estado adulto en el intestino de canidos que actúan como hospederos definitivos (perro, lobo, zorro, dingo) y en su estado larval en hígado, pulmón y otros órganos de hospederos intermediarios (bovinos, ovinos, cerdos, équidos, caprinos y animales silvestres). El parásito es también capaz de infectar al ser humano, de la misma forma que a un hospedero intermediario, al ingerir huevos que provienen de las fecas del hospedero definitivo ya sea en vegetales o agua contaminada o por contacto directo con el canido que previamente ha sido alimentado con vísceras infectadas (Thompson 2017). La enfermedad producida por *E. granulosus* se llama Equinococosis Quística (EQ) o hidatidosis y representa un serio problema de salud humana y animal en muchos países incluyendo Brasil, Uruguay, Perú, Chile y Argentina (Deplazes, Rinaldi et al. 2016). *E. granulosus* presenta gran variabilidad que ha sido caracterizada investigando diferencias morfológicas, bioquímicas, en el desarrollo en diferentes hospederos y también basadas en diferencias genéticas. El estudio de secuencias de ADN ya sea mitocondrial o nuclear ha proveído importante información y confirmación de la presencia de variantes que han permitido clasificar al parásito en cepas, genotipos y haplotipos, algunos

de los cuales han sido agrupados como diferentes especies (Bowles, Blair et al. 1992, Bowles and McManus 1993, Bowles, Blair et al. 1994, Thompson and McManus 2002, Thompson 2008, Lymbery 2016, Thompson 2017). De esta forma actualmente el nombre *E. granulosus sensu lato* (*s.l.*) agrupa a todos los parásitos responsables de la EQ; de ellos el mayor responsable de infección animal y humana es *E. granulosus sensu stricto* (*s.s.*) que incluye los genotipos G1, G2 y G3 y también micro variantes de estos genotipos; *E. equinus* que circula en el ciclo caballo-perro también conocido como G4; *E. ortleppi* que circula en el ciclo bovino-perro y es también llamado G5; *E. canadensis* es el grupo de parásitos que presenta mayor variabilidad y distribución geográfica afectando distintos hospederos agrupando a los genotipos G6-G10. Recientemente una nueva clasificación ha sido propuesta para este subgrupo en la cual los genotipos G6 y G7 son llamados *E. intermedius* mientras que los genotipos G8 y G10 siguen agrupados como *E. canadensis* (Lymbery, Jenkins et al. 2015). Sin embargo, esto no ha estado libre de controversias en la comunidad científica (Lymbery, Jenkins et al. 2015, Nakao, Lavikainen et al. 2015). La taxonomía y epidemiología molecular de *Echinococcus granulosus sensu lato* han sido revisadas de manera extensa en múltiples publicaciones (Thompson and McManus 2002, Thompson 2008, Romig, Ebi et al. 2015, Lymbery 2016). Esta revisión tiene como objetivo resumir

la información relacionada con la epidemiología molecular de *E. granulosus* s.l. en el continente Americano en el contexto de su importancia en el control y diagnóstico de este parásito.

Cepas, genotipos y haplotipos

El término **cepa** ha sido usado extensamente en el estudio de la variabilidad en *E. granulosus*, ya en los 70's, Smyth et al (1974) clasificó como dos cepas diferentes al parásito que infectaba a ovejas y caballos en el Reino Unido las que después recibieron el status de especie. Sin embargo, fue en la década de los 80's cuando este término se comenzó a usar más frecuentemente para definir variantes cuya taxonomía no estaba clara; generalmente las cepas fueron descritas basadas en diferencias en infectividad en diferentes hospederos, distribución geográfica, morfología y biología del parásito (Thompson and Lymbery 1988). Por ejemplo en los 80's se creía que en Australia, país pionero en la investigación de este parásito, existían tres diferentes cepas: dos circulando en el ciclo oveja/perro en el continente y en Tasmania y una tercera en el ciclo macropodo/dingo (Thompson and Kumaratilake 1982). Se determinó que en condiciones *in vitro* (después de 35 días de infección en perro), los parásitos adultos obtenidos de quistes originados en Tasmania producían huevos 7 días antes que los parásitos que crecieron a partir de material originado en el continente Australiano (Kumaratilake, Thompson et al. 1983). Sin embargo a inicios de los 90's Lymbery et al (Lymbery, Thompson et al. 1990) no encontraron evidencia de diferencias genéticas que permitieran distinguir poblaciones de *E. granulosus* o cepas en este país entre parásitos aislados de distintas áreas geográficas o diferentes hospederos, más aún se encontró una gran diversidad genética en el parásito demostrando la ambigüedad del término cepa.

La disponibilidad de herramientas e de biología molecular durante los 90's tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de nucleótidos entre otras, permitió analizar secuencias específicas del ADN de *Echinococcus* spp. De esta forma el término **genotipo** fue propuesto en las investigaciones realizadas en los años 90's, también en Australia por Bowles et al (1992, 1993) quienes definieron siete genotipos G1-G7 según diferencias en las secuencias de 366 y 477 nucleótidos de los genes mitocondriales *cox1* y *nadh1* respectivamente

en muestras obtenidas de diferentes hospederos y países. Este sistema contribuyó enormemente a la investigación de la variabilidad genética en este parásito; el impacto de estas publicaciones se ve reflejado en el número de oportunidades que han sido citadas en la literatura científica: 452 para la investigación en *cox1* y 203 para el estudio basado en el gen *nadh1* (Scopus, Noviembre 2016); en muchas de estas publicaciones los términos cepa y genotipo fueron tratados como sinónimos. Los genotipos fueron nombrados como "oveja (G1)", "oveja Tasmania (G2)", "búfalo (G3)", "caballo (G4)", "cepa bovino (G5)", "camello (G6)", "cerdo (G7)". Una mínima diferencia de un nucleótido fue considerada suficiente para determinar un genotipo diferente. De esta forma utilizando la secuencia de *cox1* solo 3 nucleótidos diferenciaron a los genotipos G1 y G2, 2 nucleótidos de diferencia se encontraron entre G2 y G3 y otros 2 entre G1 y G3; mientras que la diferencia entre los genotipos G6 y G7 fue de solo 1 nucleótido (Bowles, Blair et al. 1992). En el caso de *nadh1*, la secuencia amplificada resultó ser idéntica entre los genotipos G2 y G3, mientras que solo 4 nucleótidos diferenciaron G1 de G2/3 y solo 3 nucleótidos diferenciaron los genotipos G6 y G7 (Bowles and McManus 1993). El genotipo G8 o "cepa ciervo Americano" fue propuesto por Bowles et al (1994) basados en el análisis del ITS1 del DNA ribosomal usando PCR-RFLP y en la secuenciación de los genes mitocondriales *cox1* y *nadh1*. La existencia de un nuevo genotipo (G9) en muestras humanas de Polonia (cepa "humano-cerdo") fue publicado por Scott et al (Scott, Stefaniak et al. 1997); sin embargo fue confirmado posteriormente que correspondía a una micro variante del genotipo G7 (Kedra, Swiderski et al. 1999). El genotipo G10 (cepa "ciervo Fenoscandinavo") fue propuesto por Lavikainen et al (2003) usando muestras de ciervo y alce de Finlandia con la misma metodología empleada previamente. Debido a falta de material la llamada "cepa león" no fue incluida en el sistema de genotipos, sin embargo recientemente se ha aceptado su status de especie y es llamado *E. felidis* (Huttner, Nakao et al. 2008).

El término **haplotipo** define micro variantes identificadas a partir de un genotipo específico. Desde la descripción de los genotipos un gran número de publicaciones usó la misma metodología para analizar la variabilidad genética de *E. granulosus* obtenido desde distintos hospederos y zonas geográficas en el mundo lo que hizo evidente que el

parasito es mucho más variable de lo que se describió originalmente por Bowles et al (1992, 1993). Ya en el año 2002, Kamenetzky et al (2002) detectaron micro variantes del genotipo G1 en Argentina; por su parte, Obwaller et al (2004) reportaron diferencias de hasta 2.45% en muestras correspondientes al clúster G1-3 para el gen *cox1* y de hasta 1.67% para el gen *nadh1* demostrando la presencia de micro variantes de los ya conocidos genotipos G1-3; posteriormente Vural et al (2008) reportó que ninguna de las secuencias del *cox1* gen producidas a partir de 107 muestras de Turquía y caracterizadas como G1 fueron completamente idénticas a la secuencia del genotipo G1 original; finalmente Casulli et al (2012) identificó 21 “nuevos” haplotipos así como los ya conocidos G1-3 en muestras de Europa del Este e Italia basados en la secuencia parcial del mismo gen. Los haplotipos se diferencian entre uno y otro por al menos un solo nucleótido en la secuencia de ADN analizada. Basado en esta definición es posible sugerir que los genotipos G2 y G3 son haplotipos de G1. Esto ha determinado que el sistema de clasificación de la variabilidad de *E. granulosus* basado en genotipos sea considerado obsoleto cuando se requiere investigar la variabilidad en este parasito (Romig, Ebi et al. 2015). Más aun secuenciando porciones más grandes de genes mitocondriales y nucleares es posible describir incluso mayor variabilidad en *E. granulosus* (Romig, Ebi et al. 2015). Subsecuentemente un número importante de investigadores han incluido el termino **haplotipo** en la investigación de la diversidad genética en *E. granulosus*. Sin embargo, la falta de uniformidad en estos estudios ha complicado innecesariamente el entendimiento de esta variabilidad y su importancia en control y diagnóstico de este parasito.

Para que estudiar la variabilidad de *E. granulosus* s.l.?

Se ha propuesto que la variabilidad de *E. granulosus* s.l. puede tener influencias en ciclos de transmisión, especificidad de hospederos, tasa de desarrollo en hospederos intermediarios y definitivos, antigenicidad y sensibilidad a tratamiento farmacológico; todas características que pueden influir en el diseño y desarrollo de vacunas, test diagnósticos y drogas antiparasitarias (McManus 2006). Por esta razón es fundamental conocer la variabilidad del parasito en las zonas endémicas de EQ especialmente relacionado con la infectividad a humanos. Aun no es claro si variantes del parasito

presenten distinta respuesta a fármacos o si distintos haplotipos pueden producir diferencias en los ciclos de transmisión o en el desarrollo del parasito. A continuación se presenta la información que actualmente se conoce en relación a la influencia de la variabilidad del parasito en distintas características anteriormente nombradas:

Infectividad en humanos

La importancia relativa de distintos genotipos capaces de infectar humanos fue determinada por Alvarez Rojas et al (2014), de esta forma sabemos que la gran mayoría de las infecciones humanas cuyo genotipo ha sido determinado y publicado corresponden a *E. granulosus* s.s. (88.4%), mientras que *E. canadensis* G6/7 es responsable del 11% de las infecciones humanas; *E. ortleppi* y *E. canadensis* G8/10 son raros causantes de infección humana. Aunque la metodología propuesta por Bowles et al (Bowles, Blair et al. 1992, Bowles, Blair et al. 1994) resulta a estas alturas un poco antigua, aun es útil para una primera aproximación a la determinación de genotipos en zonas endémicas de EQ especialmente cuando solo se cuenta con muestras humanas contenidas en bloques de parafina. La conexión entre la especie de *E. granulosus* y la patogenicidad en humanos no es muy clara, Guarnera et al (2004) investigo la progresión de la enfermedad en humanos causada por distintos genotipos del parasito demostrando que no hay mayor diferencia clínica entre distintas variantes de *E. granulosus* s.s., sin embargo los quistes causados por G6 parecieran tener una tasa de crecimiento un poco mayor. Este genotipo ha sido también relacionado con cierto tropismo por cerebro en infecciones humanas (Sadjjadi, Mikaeili et al. 2013) aunque no posterior investigación se ha realizado para comprobar esta hipótesis.

Desarrollo del parasito adulto

Muchos de los estudios que se han realizado relacionados con el desarrollo del parasito en el intestino del perro se hicieron con material proveniente de distintos hospederos antes de la existencia de los métodos moleculares para genotipificación por lo tanto sus resultados son ambiguos cuando se intenta conectar estos

resultados con variabilidad genética del parásito. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente en los años 80's se determinaron aparentes diferencias en el crecimiento y desarrollo de parásitos adultos provenientes de material de distintas áreas de Australia así por ejemplo se reportó la posibilidad de que parásitos de Tasmania fueran más precoces en el inicio de la producción de huevos comparados con parásitos provenientes del continente Australiano en al menos 7 días (Thompson and Kumaratilake 1982, Kumaratilake, Thompson et al. 1983). Comúnmente se ha atribuido al genotipo G2 llamado "oveja Tasmania" precocidad en el periodo de pre patencia, sin embargo esto nunca ha sido comprobado, más aun el genotipo de estos parásitos no fue determinado ya que la tecnología no estaba disponible en los 80's. Este tipo de estudios se ha descontinuado principalmente por las complicaciones éticas y de bioseguridad de trabajar con canidos. Recientemente, Soriano et al (2016) realizo investigaciones similares estudiando el desarrollo del parásito del genotipo G6 proveniente de caprinos en Argentina. Se determinó un periodo de pre patencia de 41 días, basados en inspección microscópica de las fecas de dos de los perros infectados en este estudio lo que podría tener implicaciones en el control del parásito.

Fertilidad de quistes

Diferencias en fertilidad han sido observadas, generalmente *E. granulosus* s.s. es altamente fértil en ovejas sin embargo el porcentaje de fertilidad es usualmente bajo en bovinos. Esto resulta muy importante para considerar al ovino como el principal hospedero intermediario en la transmisión del parásito. En el caso de *E. ortleppi* se sabe que produce alta fertilidad en bovinos y por su capacidad de infectar humanos la presencia de este genotipo en determinadas áreas geográficas lo hace muy relevante para considerar al bovino como un importante hospedero de esta especie. En el caso de *E. canadensis* G6, Soriano et al 2010 encontró que la mayoría de los quistes en caprinos que son producidos por este genotipo están localizados en pulmón y son mayoritariamente fértiles. Así también, el genotipo G7 fue encontrado mayoritariamente en el hígado (Soriano, Pierangeli et al. 2010).

Implicaciones en el diagnostico serológico

Uno de los antígenos más usados para el diagnóstico de EQ es el AgB, ya en los 90's se sugirió que hay diferencias en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una de las subunidades de este antígeno (AgB1) aislado de distintas zonas geográficas (Frosch, Hartmann et al. 1994), sugiriendo que la variabilidad evidenciada en este parásito puede también tener consecuencias en el diagnostico cuando se usa AgB1. Posteriormente se comprobó que hay variabilidad en la secuencia del gen que codifica la proteína AgB1 en parásitos de distintos genotipos (Haag, Araujo et al. 1998). Posteriormente se reportó que el gen responsable de la proteína AgB4 está presente en distintos genotipos, mientras que el gen para la proteína AgB2 es un gen funcional solo en los genotipos G1/2 y actúa como un pseudogene en los genotipos G5 y G6/7 (Kamenetzky, Muzulin et al. 2005). Polimorfismo en diferentes genes que codifican proteínas que son secretadas y otras proteínas de membrana en *E. granulosus* incluyendo las proteínas del Antígeno B ha sido demostrado también por Rozenzvit et al (Rozenzvit, Camicia et al. 2006) quienes sugieren que esto puede tener consecuencias en métodos diagnósticos. Matsumi et al identifico que el gen que codifica para AgB5 también presenta variabilidad entre los genotipos G1 y G6 (Mamuti, Sako et al. 2007). Así también ha sido demostrado polimorfismo en el gen que codifica para el AgB1 en muestras de distintos hospederos (Pan, Bera et al. 2010, Simsek, Ozcetin et al. 2012).

Implicancias para la vacunación

La vacuna EG95 fue descubierta y desarrollada como un antígeno recombinante a partir de una proteína naturalmente expresada en las oncosferas del parásito (Lightowlers, Lawrence et al. 1996). La vacuna ha sido altamente exitosa contra infecciones experimentales en distintos países incluyendo Argentina (Lightowlers, Jensen et al. 1999) y Chile (Vivallo 2004). Recientemente la vacuna ha sido usada en vacunaciones piloto en Argentina (Larrieu, Herrero et al. 2013, Larrieu, Mujica et al. 2015) con relativo éxito. La vacuna fue desarrollada a partir de lo que se cree corresponde a *E. granulosus* s.s. y hasta ahora no existe directa evidencia si es capaz de prevenir la infección con otras especies del complejo

E. granulosus s.l. Excepto por indirecta evidencia que sugiere que los anticuerpos producidos por la vacunación con EG95 no son capaces de neutralizar completamente las proteínas EG95 expresadas por *E. canadensis* G6, sugiriendo la diferencia en epitopos de las proteínas de este genotipo. Esto hace pensar que la vacuna puede ser inefectiva a la infección con *E. canadensis* G6 (Alvarez Rojas, Gauci et al. 2013) y probablemente con otros genotipos. Interesantemente en la vacunación piloto en Argentina no se ha considerado la opción de que los animales estén siendo infectados con otro genotipo como G6 que se sabe está presente en esta área que ha sido reportado en un perro y tres humanos (Kamenetzky, Gutierrez et al. 2002).

Filogeografía y distribución de *E. granulosus* s.l.

La investigación de secuencias más largas principalmente de genes mitocondriales para la determinación de los haplotipos presentes en diferentes áreas geográficas es importante para estudios poblacionales y filogeográficos que permiten entender la dispersión del parásito en un contexto histórico. Por ejemplo, Yanagida et al (2012) propuso que el haplotipo EG01 basado en 1,609pb del gen *cox1* es localizado como eje central de redes de haplotipos en distintas partes del mundo incluyendo Irán, Jordania, China y Perú, sugiriendo que este puede ser un ancestro común de otras micro variantes de *E. granulosus* s.s. que conocemos hoy y que posiblemente se esparció en el mundo desde el momento de la domesticación de animales como los ovinos hace unos 4,000 años atrás en el Oriente medio. Similares investigaciones realizadas en otras partes del mundo también ponen al haplotipo EG01 en el centro de las redes de haplotipos en Australia (Alvarez Rojas, Ebi et al. 2016). La gran diversidad descubierta sugiere que el parásito tuvo múltiples entradas al país (Lymbery 2016), siendo probablemente los orígenes en Europa y el norte de África. Con una situación similar descrita para el parásito en Chile (Alvarez Rojas, Ebi et al. 2016) y Rusia (Konyaev, Yanagida et al. 2012, Konyaev, Yanagida et al. 2013). Recientemente un nuevo genotipo de *E. granulosus* s.s. ha sido identificado en el sur de Etiopía a partir de un quiste humano, este genotipo es claramente distinguible del clúster G1-G3 (Wassermann, Woldeyes et al. 2016) lo que ha puesto en duda el origen de *E. granulosus* en el

Oriente Medio. Recientemente se ha confirmado la variabilidad genética en *E. ortleppi*, investigaciones de Addy et al (Addy, Wassermann et al. 2016) detectaron 15 *cox1* y 6 *nadh1* haplotipos respectivamente y 20 haplotipos cuando estas secuencias se usan concatenadas. También se han descrito haplotipos de G8 y G10 (Moks, JÖGisalu et al. 2008).

***Epidemiología molecular de E. granulosus* s.l. en el continente Americano**

Argentina

Investigadores en Argentina como Mara Rozenzvit y Laura Kamenetzky fueron pioneras en el estudio de epidemiología molecular de *E. granulosus* en Sudamérica. Rozenzvit et al (1999) describieron por primera vez la variabilidad genética de *E. granulosus* en Argentina usando PCR-RFLP del ITS1 y secuenciación de secciones de los genes mitocondriales *cox1* (391pb) y *nad1* (471pb). A partir de 33 muestras se determinó la presencia de G1 (Número de acceso GenBank: U50464) en 7 ovinos de Chubut y 4 humanos de Rio Negro, G2 en 2 ovinos y 1 humano de Tucumán, G6 en 3 humanos de Rio Negro y 1 de Buenos Aires y G7 en 15 cerdos de Santa Fe. Con esta información, los autores sugirieron que la presencia del genotipo G2 podría deberse a la importación de ovinos en el pasado desde Australia lo que hoy sabemos es altamente discutible pues es también probable que esta micro variante de *E. granulosus* s.s. llegó a América y Argentina con la colonización Española. Estas mismas muestras fueron usadas por Zhang et al (1999) en una comparación con 40 muestras de China mediante el análisis de genes mitocondriales *cox1* y *nad1* basado en Bowles et al (1992, 1993). Posteriormente, Kamenetzky et al (2000) analizaron 10 muestras de distintas especies para determinar un método para la extracción de ADN de la membrana germinativa de quistes fértiles e infértiles. Basados en 379pb del gen *cox1* 9 muestras fueron clasificadas como G1 (2 ovinos y 1 humano de Rio Negro, 2 bovinos de Corrientes), otras tres muestras fueron clasificadas como G1, sin embargo los autores describen polimorfismo en estas secuencias entendiéndolo que se trata de dos haplotipos de G1: en dos muestras bovinas de Tucumán y una muestra

humana de Santiago del Estero. Una muestra de cerdo de Tucumán fue clasificada como G7. Kamenetzky et al (2002) publicaron la más amplia investigación de variabilidad genética de *E. granulosus* en Sudamérica analizando 147 muestras en total incluyendo 5 de Brasil, 1 de Bolivia, 3 de Chile, 3 de Perú y 1 de Uruguay. En total de las 134 muestras de Argentina 65 correspondieron a G1, 11 a G2, 5 a G5, 28 a G6 y 27 como G7. Este fue el primer reporte de G5 en Sudamérica (Argentina y Brasil), incluyendo 1 muestra humana en Argentina. Cinco haplotipos de G1 fueron descritas en este estudio denominadas G1^A-G1^E. Así también fue detectada variabilidad en el genotipo G7 (G7^A) y también fue detectada la infección mixta en un perro con los genotipos G1 y G6. Haplotipos de *E. granulosus* s.s. y de *E. canadensis* G7 fueron descritas en Argentina por Haag et al (Haag, Ayala et al. 2004) en 113 muestras de distintas partes de Argentina. Lamentablemente los autores no proporcionaron el origen exacto de las muestras y solo se refirieron a ellas si fueron obtenidas en el Norte, Centro o Sur de Argentina. Los autores insisten en que es posible que el genotipo G2 haya llegado a Argentina procedente desde Australia. Los autores intentaron hacer interesantes correlaciones entre los haplotipos descritos y el movimiento de animales dentro del país, interesantemente algunos haplotipos parecen tener cierta restricción geográfica en Argentina, desafortunadamente este tipo de investigación no tuvo continuidad.

Solo *E. granulosus* s.s. fue encontrado en la primera investigación de epidemiología molecular del parásito en la isla Tierra del Fuego (cuya soberanía es compartida con Chile) en 8 muestras de ovinos de la parte Argentina de la isla (Zanini, Gonzalo et al. 2006), futuras investigaciones son necesarias para comprobar si en la Isla de Tierra del Fuego existe menos variabilidad quizás por el aislamiento geográfico de esta zona de Argentina y Chile.

Andresiuk et al (2009) también describió haplotipos de *E. granulosus* s.s. comparando muestras de bovinos de Argentina (Buenos Aires) y España usando 366pb del gen *cox1* y 471pb del gen *nadh1*.

Soriano et al (2010) identificó a los caprinos como reservorio del genotipo G6 en la Provincia de Neuquén en la Patagona Argentina ya que 21 de 23 muestras de caprinos pertenecieron a este genotipo, así también una muestra canina fue identificada de la misma manera. El genotipo G7 fue identificado en 18 muestras de cerdos y el genotipo G3 fue identificado

en 1 oveja, G1 en 15 ovinos, 2 caprinos y nueve caninos; tres haplotipos de G1 fueron identificados (GU980906-14). Esta fue la primera vez que el genotipo G3 fue hallado en Argentina y Sudamérica. Andresiuk et al (2012) estudiaron 42 muestras de bovinos y 34 de ovinos analizados con 339pb del gen *cox1* y 871pb del gen *nadh1*, todas las muestras fueron identificadas como G1 excepto por una muestra de ovinos que fue descrita como G2 y una muestra de bovinos que fue diagnosticada como G5. Sin embargo siete haplotipos de G1 fueron descritos (C1-C7), C1-C3 previamente descritos en Argentina, la gran mayoría de las muestras (31 bovinos y 24 ovinos correspondieron a C1, C2 (2 bovinos), C3 (3 bovinos y 3 ovinos), C4 (1 bovino), C5 (1 bovino), C6 (1 ovino) y C7 (5 ovinos); mientras que haplotipos C4-C7 fueron descritos por primera vez. Las 871pb del gen *nadh1* demostraron la presencia de 3 haplotipos (N1-N3). Finalmente *E. granulosus* s.s. fue encontrado en solo 1 de 34 zorros de la provincia de Buenos Aires (Scioscia, Petrigh et al. 2016).

Finalmente Laurimae et al (Laurimae, Kinkar et al. 2016) detectó 29 haplotipos a partir de 52 muestras con muestras de cuatro países de América. De 36 muestras extraídas desde Argentina (16 bovinos, 19 ovinos), la mayor parte de los cuales provenía de Buenos Aires se obtuvieron 17 haplotipos diferentes, el haplotipo ARG01 (KX039937) fue el más comúnmente encontrado en 16 muestras sugiriendo para los autores que este puede ser un genotipo ancestral de los otros encontrados en Argentina por su localización central en la el diagrama de la red de haplotipos el halogruppo 1. Sin embargo es importante recordar que el número de muestras analizadas es bajo (36) y más aún muchas de ellas provienen de la misma área geográfica. Los autores señalan que el transporte de animales como la mayor causa de la variabilidad encontrada, sin embargo es más posible que esta se deba a la múltiple entrada del parásito desde los tiempos de la colonización española.

Brasil

E. granulosus s.s. está presente en Brasil junto a *E. ortleppi* y *E. canadensis* G7 principalmente en el estado de Rio Grande do Sul. Siete variantes del genotipo G1 fueron identificadas por Haag et al (1999) basados en el análisis de 6 genes (EgAg4, EgAgB/1, EgAg6, EgHbx2, EgActIII y EgND1(*nadh1*)), de los cuales EgAg4 y EgAg6 presentaron el mayor polimorfismo.

En cuanto al genotipo G2 tres variantes de este genotipo fueron encontradas en las muestras de Brasil; el gen *cox1* no fue analizado. Estas muestras fueron también estudiadas en investigaciones previas (Haag, Araujo et al. 1998) que pretendían elucidar el sistema de reproducción de *E. granulosus*. En otra investigación con muestras de Brasil, 38 muestras descritas como G1 basados en la secuencia del gen *cox1*, incluyendo 26 muestras de bovinos y 12 muestras de ovinos mientras que dos muestras de bovinos correspondieron al genotipo G5, lamentablemente las secuencias no están disponibles en bases de datos como GenBank (de La Rue, Dinkel et al. 2006). Las muestras fueron recolectadas de tres ciudades del estado de Rio Grande do Sul incluyendo: Santa Maria, Bagé y Rosário do Sul. Desafortunadamente no se entregan más datos del lugar exacto donde el genotipo G5 fue encontrado, esto podría tener consecuencias en la diversidad genética de *Echinococcus granulosus* en Uruguay, país limítrofe con Brasil, de hecho la ciudad de Bagé se encuentra a solo 46 km del borde con Uruguay.

Genotipos G1 y G3 así como G5 fueron identificados en humanos y animales en muestras del sur de Brasil (Santana do Livramento, Rio Grande do Sul). Seis muestras de humanos y parásitos adultos obtenidos desde 12 perros fueron usadas para amplificar secciones de los genes *cox1* (395pb) y 12S rRNA (313pb). Se detectó G1 en cuatro casos humanos, G3 y G5 en otras dos muestras humanas. En el caso de los parásitos adultos, 10 muestras fueron identificadas como G1 uno como G3 y uno como G5. Siete de los parásitos adultos fueron 100% idénticos a M84661, cuatro muestras humanas y tres de perro fueron identificados como 4 micro variantes de G1. La secuencia M84663 (G3) fue encontrada en una muestra de perro y una humana, los autores señalan la importancia de diagnosticar G3 por primera vez en Sud América (de la Rue, Takano et al. 2011). Cuando se analizó la secuencia del 12S rRNA se encontraron diferencias entre G1, G3 y G5, sin embargo no se detectó variabilidad entre las muestras de cada genotipo. Las secuencias del 12S rRNA gen de G1 fueron 100% idénticas a AB451502. Santana do Livramento es una ciudad que está dividida por la frontera entre Brasil y Uruguay, esto hace aún más importante la investigación del posible infección con G5 en Uruguay dada la cercanía con focos de este genotipo en Brasil.

Balbinotti et al (Balbinotti, Santos et al. 2012) analizo el mayor número de muestras publicado hasta ahora en Sudamérica, en este caso de bovinos del estado de Rio Grande do Sul. Secuenciando 444pb del gen *cox1* de un total de 638 quistes fértiles: 361 fueron identificados como G1 (56.6%), mientras que 277 quistes fueron identificados como G5 (43.4%). De 40 quistes infértiles 37 fueron identificados como G1 (92.5%) y 3 como G5 (7.5%). Los autores sugieren un incremento en la prevalencia de G5 en Brasil en los últimos años, especialmente la alta tasa de G5 en quistes fértiles remarca la importancia de la detección de este genotipo dado que es infectivo para humanos. Finalmente Monteiro et al (2014) publicaron resultados de las secuencias del gen *cox1* de *E. granulosus* obtenido de cerdos en el estado de Rio Grande do Sul entre 2008 y 2011. Cinco muestras fueron genotipificadas, en 2 de ellas se identificó G1 mientras que G7 estuvo presente en las tres restantes. Laurimae et al (Laurimae, Kinkar et al. 2016) analizo 9 muestras de bovinos de Brasil de los cuales se describieron 6 haplotipos basados en 8,279pb del genoma mitocondrial de *E. granulosus s.s.*

Bolivia

La información con respecto a la epidemiología de la EQ en Bolivia es más bien escasa, más aun cuando se trata de saber que especies o genotipos de *E. granulosus* están presentes en este país. La única información disponible es de una muestra extraída de humano clasificada como G1 por Kamenetzky et al (Kamenetzky, Canova et al. 2000).

Chile

Solo tres estudios relacionados con la variabilidad genética de *E. granulosus* en Chile han sido publicados. Primero, Manterola et al (Manterola, Benavente et al. 2008) analizo la secuencia de 366pb del gen *cox1* a partir de 20 muestras de quistes hidatídicos extraídos a humanos de Temuco (Región Araucanía). Del total de 20 muestras, 19 fueron identificadas como *E. granulosus s.s.* y una muestra correspondió con el genotipo G6 de *E. canadensis*, lamentablemente no hay información con respecto a si este paciente se infectó en territorio Chileno. El segundo trabajo publicado con información de Chile reporto la presencia de *E. granulosus s.s* (G1) en 12 quistes de bovinos y una de humano así como

una variante no previamente descrita muy similar a G3 (Espinoza, Salas et al. 2014). Recientemente Alvarez et al (Alvarez Rojas, Ebi et al. 2016) analizo la micro diversidad de 69 muestras de *E. granulosus* s.s. obtenidos desde distintas regiones de Chile. En este trabajo se usó una secuencia de 1,609 pb del gen mitocondrial *cox1* permitiendo comprender en forma detallada la variabilidad de este parasito. La comparación de las secuencias obtenidas en este estudio con secuencias del mismo gen obtenidas a partir de *E. granulosus* s.s. de otros lugares del mundo permitió identificar al haplotipo EG01 como el más común entre las muestras analizadas. Finalmente, Laurimae et al (Laurimae, Kinkar et al. 2016) analizo 6 muestras de bovinos de Chile encontrando 4 haplotipos diferentes basados en 8,279pb del genoma mitocondrial de *E. granulosus* s.s.

Perú

Santiváñez et al (2008) describió la presencia de *E. granulosus* s.s. en 19 muestras humanas y *E. canadensis* G6 en una muestra del mismo país. Moro et al (2009) analizo 71 muestras (32 ovinos, 16 bovinos, 12 porcinos, 6 caprinos and 5 humanos); 57 de estas muestras corresponden a cinco haplotipos diferentes de *E. granulosus* s.s. designados Egra-A (accession number: AB458672), Egra-B (AB458673), Egra-C (AB458674), Egra-D (AB458675) y Egra-E (AB470527). Siete muestras correspondieron al genotipo G6 de *E. canadensis* (5 caprinos y 1 humano), a partir de estas muestras se determinaron dos haplotipos designados Ecan-A (AB458676) y Ecan-B (AB458677). Ocho muestras de cerdos fueron identificados como un único haplotipo de G7 denominado Ecan-C (AB458678). En el caso de la secuencia del gen nuclear *ef1a*, este pudo ser amplificado en 67 de las 71 muestras. De estas, 55 correspondieron a *E. granulosus* s.s. y 12 muestras correspondieron a *E. canadensis*, en este caso las secuencia de *ef1a* fue 100% idéntica entre G6 y G7. Esta fue la primera vez en la que el genotipo G7 fue descrito en Perú, las muestras fueron obtenidas en las cercanías de Lima lo que sugiere riesgo para infección humana. Sánchez et al (Sanchez, Caceres et al. 2010) estudiaron 96 muestras que fueron 100% idénticas al genotipo G1 como fue descrito por Bowles et al. 1992. Tres muestras de Ayacucho fueron idénticas a una micro variante de G1 (EU178104) previamente descrita en Turquía por Vural et al

(Vural, Baca et al. 2008). Cuatro quistes hidatídicos obtenidos de llamas de la localidad de Puno y 8 de cerdos de Ayacucho fueron analizados por Sánchez et al (Sanchez, Caceres et al. 2012) amplificando el gen *cox1* (399pb) y *nad1* (765pb). Las muestras de alpacas y cuatro de los cerdos fueron clasificadas como G1; de ellas una muestra de alpaca y tres de cerdo fueron 100% idénticas a las referencias usadas para este genotipo por estos autores (U50464, GU233854 originalmente descrito en Puno (Sanchez, Caceres et al. 2010) y GU233945 originalmente descrita en Ayacucho (Mata-Miranda, Osnaya-Palma et al. 2007); las otras tres muestras de alpaca y una de cerdo fueron idénticas al genotipo G1 descrito por Bowles et al (M84661). Las cuatro restantes muestras de cerdo correspondieron al genotipo G7. Yanagida et al (Yanagida, Mohammadzadeh et al. 2012) analizo treinta muestras fueron seleccionadas aleatoriamente a partir de 57 muestras originalmente analizadas por Moro et al (Moro, Nakao et al. 2009). Solo tres haplotipos fueron descritos a partir de estas treinta muestras: el haplotipo EG01 en 16 muestras, el haplotipo EG44 en 13 y el haplotipo EG43 en una.

Uruguay

La información relevante con epidemiología molecular de *E. granulosus* es muy escasa, cinco muestras de bovinos han sido caracterizados como *E. granulosus* s.s. (G1) (Kamenetzky, Gutierrez et al. 2002, Cucher, Macchiaroli et al. 2016). *E. ortleppi* ha sido recientemente descrito afectando dos muestras de bovinos de este país (Cucher, Macchiaroli et al. 2016). Interesantemente, *E. granulosus* s.s. (G1) fue detectado en un gato doméstico que estuvo asociado a un cuadro de inmunodeficiencia felina lo que puede explicar en parte el desarrollo de este parasito en el gato el cual no es usualmente un hospedero intermediario para este parasito (Armua-Fernandez, Castro et al. 2014).

México y América Central

E. granulosus no representa un mayor problema en México ni en América Central. Solo esporádicos reportes han sido publicados con escasa información relevante a la epidemiología molecular del parasito en esta área. Se sabe que *E. canadensis* G7 está presente en cerdos en México así como *E. ortleppi* (Maravilla, Thompson et al. 2004). En otra publicación se

confirmó la presencia de *E. canadensis* G7 en cinco quistes de hígado porcino así como *E. granulosus* s.s. (Villalobos, González et al. 2007). Los autores describen la presencia de haplotipos de este parásito en las muestras analizadas. Subsecuentemente la variabilidad genética de *E. canadensis* G7 fue confirmada en México sugiriendo que el parásito arribó a este territorio en múltiples ocasiones (Rodríguez-Prado, Jimenez-Gonzalez et al. 2014). Recientemente una sola muestra de *E. granulosus* s.s. de México fue incluida en la investigación secuenciando 8,279pb del genoma mitocondrial; la secuencia fue agrupada en un haplotipo específico con muestras de Sudamérica (Laurimae, Kinkar et al. 2016). Lamentablemente no hay información de epidemiología molecular de algún caso de EQ de América Central como Guatemala, El Salvador, Honduras, Cuba, Panamá (Sousa and Lombardo Ayala 1965, Sanchez, De Bernard et al. 1992) y Costa Rica (Brenes Madrigal, Sousa et al. 1977) o Cuba que es el único país que reporta transmisión autóctona del parásito (González Núñez, Díaz Jidy et al. 2001, Escalante, Espinosa Gómez et al. 2012).

Estados Unidos y Canadá

El principal parásito responsable de la EQ en estos dos países es *E. canadensis* (G8 y G10) asociado a ciervos como hospederos intermediarios (como *Alces alces*, *Rangifer tarandus* y *Cervus canadensis*) y el lobo (*Canis lupus*) como hospedero definitivo en Canadá, Alaska y la frontera de USA con Canadá. *E. canadensis* G10 ha sido documentado en un ciervo en el estado de Washington mientras que G8 ha sido reportado en Alaska, Minnesota y Maine Maine (Bowles, Blair et al. 1994, Thompson, Boxell et al. 2006, Lichtenwalner, Adhikari et al. 2014). *E. canadensis* (G8) ha sido identificado en un humano en Alaska (McManus, Zhang et al. 2002), asumiendo que la mayor parte de los casos humanos corresponden a personas que se han infectado en otros países. *E. canadensis* (G8 y G10) han sido reportados en animales silvestres en Canadá (Thompson, Boxell et al. 2006, Schurer, Shury et al. 2013, Schurer, Gesy et al. 2014). Lobos infectados con *E. Canadensis* G8 han sido encontrados en British Columbia, Saskatchewan, Manitoba, y los territorios al noroeste, lobos infectados con *E. Canadensis* G10 tienen una distribución similar además de encontrarse en el estado de Alberta (Thompson,

Boxell et al. 2006, Bryan, Darimont et al. 2012, Schurer, Gesy et al. 2014). *E. canadensis* (G10) ha sido descrito en perros domésticos en Saskatchewan (Himsworth, Jenkins et al. 2010). Mientras que el ganado (ovinos, porcinos y bovinos) se han visto tradicionalmente afectados por *E. granulosus* s.s. Ya que la enfermedad no es considerada importante en estos países, recientes estudios de parásitos en perros no han buscado la presencia de *E. granulosus* lo que impide tener mayor información de especies o genotipos circulando (Gates and Nolan 2009, Little, Johnson et al. 2009).

Conclusiones

El conocimiento de la epidemiología molecular de *E. granulosus* s.l. en el continente Americano es aun incompleto. Por un lado existe un profundo conocimiento de la presencia de genotipos en Argentina. Así mismo investigadores de Perú y Brasil han producido importante información con referencia a los genotipos presentes en los respectivos territorios. Sin embargo aún son necesarios este tipo de estudios en países como Chile, Uruguay y Bolivia. En relación a la vacuna EG95 sería importante considerar análisis moleculares de quistes encontrados en animales vacunados en el territorio Argentino y también en programas pilotos que se están realizando en dos regiones de Chile. Esto para determinar si la vacuna es capaz de proteger contra otras especies que no sean *E. granulosus* s.s. Así mismo es importante considerar que antígenos usar para el diagnóstico de esta enfermedad en áreas donde más de una especie del parásito está presente. Además es importante poder determinar si la presencia de distintos haplotipos del parásito puede producir diferencias en patrones de transmisión de la enfermedad. Finalmente como fue mencionado anteriormente, la colaboración entre investigadores es vital para proveer de importantes nuevos conocimientos que puedan ayudar a un mejor diseño de los programas de control de esta enfermedad.

Referencias

- Addy F, Wassermann M, Banda F, Mbaya H, Aschenborn J, Aschenborn O, et al. Genetic polymorphism and population structure of *Echinococcus orteppi*. Parasitology; 2016: 1-9.
- Alvarez Rojas CA, Ebi D, Gauci CG, Scheerlinck JP, Wassermann M, Jenkins DJ., et al. Microdiversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Australia. Parasitology 2016; 143(8): 1026-1033.
- Alvarez Rojas CA, Ebi D, Paredes R, Acosta-Jamett G, Urriola N, Roa JC, et al. High intraspecific variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Chile. Parasitol Int 2016; 66(2): 112-115.
- Alvarez Rojas CA, Gauci CG, Lightowers MW. Antigenic differences between the EG95-related proteins from *Echinococcus granulosus* G1 and G6 genotypes: implications for vaccination. Parasite Immunology 2013; 35(2): 99-102.
- Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowers MW. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans--review of current knowledge. Int J Parasitol 2014; 44(1): 9-18.
- Andresiuk MV, Gordo FP, Bandera CC, Elissondo MC, Dopchiz M, Denegri G. *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain. Rev Argent Microbiol 2009; 41(4): 218-225.
- Andresiuk MV, Gordo FP, Saarma M, Elissondo MC, Taraborelli A, Casalongue C, et al. *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 2013; 127(2): 136-142.
- Armua-Fernandez MT, Castro OF, Crampet A, Bartzabal A, Hofmann-Lehmann R, Grimm F, et al. First case of peritoneal cystic echinococcosis in a domestic cat caused by *Echinococcus granulosus sensu stricto* (genotype 1) associated to feline immunodeficiency virus infection. Parasitol Int 2014; 63(2): 300-302.
- Balbinotti H, Santos GB, Badaraco J, Arend AC, Graichen DAS, Haag KL, et al. *Echinococcus orteppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. Veterinary Parasitology 2012; 188(3-4): 255-260.
- Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. Genetic-Variants within the Genus *Echinococcus* Identified by Mitochondrial-DNA Sequencing. Molecular and Biochemical Parasitology 1992; 54(2): 165-174.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*." Parasitology 1994; 109 (Pt 2): 215-221.
- Bowles J, McManus DP. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. International Journal for Parasitology 1993; 23(7): 969-972.
- Brenes Madrigal RR, Sousa OE, Bonilla MA, Achit SM. 1st case of human hepatic hydatidosis in Costa Rica]. Rev Cubana Med Trop 1977; 29(1): 5-8.
- Bryan HM, Darimont CT, Hill JE, Paquet PC, Thompson RC, Wagner B, et al. Seasonal and biogeographical patterns of gastrointestinal parasites in large carnivores: wolves in a coastal archipelago. Parasitology 2012; 139(6): 781-790.
- Caullu A, Interisano M, Sreter T, Chitimia L, Kirkova Z, La Rosa G, et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. Infect Genet Evol 2012; 12(2): 377-383.
- Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi G, Camicia F, Prada L, Maldonado L, et al. 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 2016; 21(2): 166-175.
- de La Rue M, Dinkel A, Mackenstedt U, Romig T. New data on *Echinococcus spp.* in Southern Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2006; 48: 103-104.
- De La Rue ML, Takano K, Brochado JF, Costa CV, Soares AG, Yamano K, et al. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. orteppi* in Southern Brazil. Vet Parasitol 2011; 177(1-2): 97-103.
- Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson P, Majid F, Harandi MF, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis." Advances in Parasitology 2016; (in press).
- Escalante GE, Espinosa Gómez I, González Ricardo Y. Hidatidosis pulmonar en niño. Presentación de un caso. MediSur 2012; 10: 310-313.
- Espinosa S, Salas AM, Vargas A, Freire V, Diaz E, Sanchez G, et al. Detection of the G3 genotype of *Echinococcus granulosus* from hydatid cysts of Chilean cattle using COX1 and ND1 mitochondrial markers. Parasitol Res 2014; 113(1): 139-147.
- Frosch P, Hartmann M, Mühlischlegel F, Frosch M. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. Molecular and Biochemical Parasitology 1994; 64(1): 171-175.

- Gates MC, Nolan TJ. Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Vet Parasitol* 2009; 166(1-2): 153-158.
- González Núñez I, Díaz Jidy M, Núñez FA, González Díaz OM. Infección por *Echinococcus granulosus* (quiste hidatídico): Reporte de un caso. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2001; 53: 217-221.
- Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, Garcia G, Gutierrez A. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Tropica* 2004; 92(2): 153-159.
- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RC, Zaha A. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* 1999; 118 (Pt 1)(1): 63-71.
- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Zaha A. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(5): 695-702.
- Haag K L, Ayala FJ, Kamenetzky L, Gutierrez AM, Rosenzvit M. Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol* 2004; 90(2): 234-239.
- Himsworth CG, Jenkins E, Hill JE, Nsungu M, Ndao M, Andrew Thompson RC, et al. Emergence of sylvatic *Echinococcus granulosus* as a parasitic zoonosis of public health concern in an indigenous community in Canada. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(4): 643-645.
- Huttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion." *Int J Parasitol* 2008; 38(7): 861-868.
- Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, Rosenzvit MC . *Echinococcus granulosus*: DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and nonfertile hydatid cysts. *Exp Parasitol* 2000; 95(2): 122-127.
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, et al. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol* 2002; 2(2): 129-136.
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, et al. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection Genetics and Evolution* 2002; 2(2): 129-136.
- Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM, Angel SO, Zaha A, Guarnera EA, et al. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2005; 131(6): 805-815.
- Kedra AH, Swiderski Z, Tkach VV, Dubinsky P, Pawlowski Z, Stefaniak J, et al. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study." *Acta Parasitologica* 1999; 44(4): 248-254.
- Konyaev SV, Yanagida T, Ingovatova GM, Shoikhet YN, Nakao M, Sako Y, et al. Molecular identification of human *echinococcosis* in the Altai region of Russia. *Parasitol Int* 2012; 61(4): 711-714.
- Konyaev SV, Yanagida T, Nakao M, Ingovatova GM, Shoykhet YN, Bondarev AY, et al. Genetic diversity of *Echinococcus spp.* in Russia. *Parasitology* 2013; 140(13): 1637-1647.
- Kumaratilake LM, Thompson RCA, Dunsmore JD. Comparative strobilar development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin from different geographical areas of Australia in vivo and in vitro. *International Journal for Parasitology* 1983; 13(2): 151-156.
- Larrieu E, Herrero E, Mujica G, Labanchi JL, Araya D, Grizmodo C, et al. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic *echinococcosis* in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data. *Acta Trop* 2013; 127(2): 143-151.
- Larrieu E, Mujica G, Gauci CG, Vizcaychipi K, Seleiman M, Herrero E, et al. Pilot Field Trial of the EG95 Vaccine Against Ovine Cystic *Echinococcosis* in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(10): e0004134.
- Laurimae T, Kinkar L, Andresiuk V, Haag KL, Ponce-Gordo F, Acosta-Jamett G, et al. 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* 2016; 45: 290-296.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2013; 127(3): 207-215.
- Lichtenwalner A, Adhikari N, Kantar L, Jenkins E, Schurer J. *Echinococcus granulosus* genotype G8 in maine moose (*Alces alces*). *Alces* 2014; 50: 27-33.
- Lightowers MW, Jensen O, Fernandez E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, et al. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int J Parasitol* 1999; 29(4): 531-534.

- Lightowers M W, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology* 1996; 18(9): 457-462.
- Little SE, Johnson EM, Lewis D, Jaklitsch RP, Payton ME, Blagburn BL, et al. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Vet Parasitol* 2009; 166(1-2): 144-152.
- Lymbery AJ. Phylogenetic Pattern, Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology*, 2016; Academic Press.
- Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RC. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends Parasitol* 2015; 31(1): 23-29.
- Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RC. Response to Nakao et al. - is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends Parasitol* 2015; 31(8): 343-344.
- Lymbery A J, Thompson RCA, Hobbs RP. Genetic diversity and genetic differentiation in *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia. *Parasitology* 1990; 101(2): 283-289.
- Mamuti W, Sako Y, Bart JM, Nakao M, Ma X, Wen H, et al. Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6." *Parasitology International* 2007; 56(4): 313-316.
- Manterola C, Benavente F, Melo A, Vial M, Roa JC. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitol Int* 2008; 57(3): 342-346.
- Maravilla P, Thompson RCA, Palacios-Ruiz JA, Estcourt A, Ramirez-Solis E, Mondragon-de-la-Pena C, et al. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop* 2004; 92(3): 231-236.
- Mata-Miranda P, Osnaya-Palma I, Rodriguez-Prado U, Gutierrez-Marin A, Tawil M, Hernandez-Gonzalez S, et al. Epidemiologic and ultrasonographic study of echinococcosis in a community in the state of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(3): 500-503.
- McManus DP. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol Int* 2006; 55 Suppl: S31-37.
- McManus DP, Zhang L, Castrodale LJ, Le TH, Pearson M, Blair D. 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* 2002; 67(3): 296-298.
- Moks E, JÖGisalu I, Valdmann H, Saarma U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 2008; 135(5): 647-654.
- Monteiro DU, Botton SA, Tonin AA, Azevedo MI, Graichen DAS, Noal CR, et al. *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in swine of southern Brazil." *Veterinary Parasitology* 2014; 202(3-4): 335-338.
- Moro PL, Nakao M, Ito A, Schantz PM, Caverio C, Cabrera L. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitology International* 2009; 58(2): 184-186.
- Moro PL, Nakao M, Ito A, Schantz PM, Caverio C, Cabrera L. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol Int* 2009; 58(2): 184-186.
- Nakao M, Lavikainen A, Hoberg E. Is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends Parasitol* 2015; 31(8): 342-343.
- Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, et al. *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 2004; 128(5): 569-575.
- Pan D, Bera AK, Das SK, Bandyopadhyay S, Manna B, Bhattacharya D. Polymorphism and natural selection of antigen B1 of *Echinococcus granulosus* isolated from different host assemblages in India. *Mol Biol Rep* 2010; 37(3): 1477-1482.
- Rodriguez-Prado U, Jiménez-González DE, Avila G, González AE, Martínez-Flores WA, Mondragon de la Pena C, Hernández-Castro R, et al. Short report: Genetic variation of *Echinococcus canadensis* (G7) in México. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(6): 1149-1153.
- Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Veterinary Parasitology* 2015; 213(3-4): 76-84.
- Rosenzvit MC, Camicia F, Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM. Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus*." *Parasitology International* 2006; 55, Supplement: S63-S67.
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 1999; 118 (Pt 5): 523-530.

- Sadjjadi SM, Mikaeili F, Karamian M, Maraghi S, Sadjjadi FS, Shariat-Torbaghan S, Kia EB. Evidence that the *Echinococcus granulosus* G6 genotype has an affinity for the brain in humans. *International Journal for Parasitology* 2013; 43(11): 875-877.
- Sanchez E, Caceres O, Naquira C, Garcia D, Patino G, Silvia H, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(6): 806-810.
- Sánchez E, Caceres O, Naquira C, Miranda E, Samudio F, Fernandes O. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(2): 275-278.
- Sánchez GA, De Bernard C, Sousa OE. Hepatic polycystic hydatidosis. Clinical and histopathologic report of the second native case of echinococcosis in the Republic of Panama]. *Rev Med Panama* 1992; 17(1): 3-11.
- Santivañez S J, Gutierrez AM, Rosenzvit MC, Muzulin PM, Rodriguez ML, Vasquez JC, et al. Human Hydatid Disease in Peru Is Basically Restricted to *Echinococcus granulosus* Genotype G1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2008; 79(1): 89-92.
- Schurer J, Shury T, Leighton F, Jenkins E. Surveillance for *Echinococcus canadensis* genotypes in Canadian ungulates. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2013; 2: 97-101.
- Schurer JM, Gesy KM, Elkin BT, Jenkins EJ. *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus canadensis* in wolves from western Canada. *Parasitology* 2014; 141(2): 159-163.
- Scioscia NP, Petrih RS, Beldomenico PM, Fugassa M, Denegri GM. Survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in Buenos Aires province, Argentina. *Acta Tropica* 2016; 158: 1-5.
- Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus PD. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1997; 114 (Pt 1): 37-43.
- Simsek S, Ozcetin C, Balkaya I. Detection of polymorphism in AgB1 gene from sheep, cattle and human isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP. *Vet Parasitol* 2012; 184(2-4): 352-355.
- Smyth JD, Davies Z. Occurrence of physiological strains of *Echinococcus granulosus* demonstrated by in vitro culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. *International Journal for Parasitology* 1974; 4(4): 443-445.
- Soriano SV, Debiaggi ME, Pierangeli NB, Pianciola LA, Bergagna HF, Lazzarini LE, et al. First study about the development of adult *Echinococcus canadensis* G6 genotype of goat origin in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol* 2016; 228: 6-12.
- Soriano SV, Pierangeli NB, Pianciola L, Mazzeo M, Lazzarini LE, Saiz MS, et al. Molecular characterization of *Echinococcus isolates* indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquen, Patagonia Argentina. *Parasitol Int* 2010; 59(4): 626-628.
- Sousa OE, Lombardo Ayala JD. Informe de un caso de hidatidosis den sujeto nativo Panameno. Primer caso autoctono. *Archivos Medicos Panamenos* 1965; 14: 79-86.
- Thompson RC, Boxell AC, Ralston BJ, Constantine CC, Hobbs RP, Shury T, et al. and M. E. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus in cervids* from North America." *Parasitology* 2006; 132(Pt 3): 439-447.
- Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*." *Trends Parasitol* 2002; 18(10): 452-457.
- Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology* 2008; 119(4): 439-446.
- Thompson RCA. *Biology and Systematics of Echinococcus*. *Advances in Parasitology* 2017; , Academic Press.
- Thompson RCA, Kumaratilake LM. Intraspecific variation in *Echinococcus granulosus*: the Australian situation and perspectives for the future. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; 76(1): 13-16.
- Thompson RCA, Lymbery AJ. The Nature, Extent and Significance of Variation within the Genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology*. J. R. Baker and R. Muller, Academic Press. 1988; Volume 27: 209-258.
- Villalobos N, González LM, Morales J, de Aluja AS, Jiménez MI, Blanco MA, et al. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico." *Veterinary Parasitology* 2007; 147(1-2): 185-189.
- Vivallo I. Evaluacion de la vacuna Eg 95 contra hidatidosis, en ovinos. *Medicina Veterinaria, Universidad de Concepcion* 2004.

Vural G, Baca AU, Gauci GC, Bagci O, Gicik Y, Lightowlers MW. 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* 2008; 154(3-4): 347-350.

Wassermann M, Woldeyes D, Gerbi BM, Ebi D, Zeyhle E, Mackenstedt U, et al. A novel zoonotic genotype related to *Echinococcus granulosus sensu stricto* from southern Ethiopia. *Int J Parasitol* 2016; 46(10): 663-668.

Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, Nakao M, Sadjjadi SM, Hijjawi N, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. *Parasitol Int* 2012; 61(4): 599-603.

Zanini F, Gonzálo R, Pérez H, Aparici I, Soto X, Guerrero J, et al. Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999. *Vet Parasitol* 2006; 138(3-4): 377-381.

Zhang L, Gasser RB, Zhu X, McManus DP. Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(3): 329-334.

Hidatidosis: un problema no resuelto en Chile

MARTINEZ P.¹, CÁCERES D.^{2,3}, CANALS M.^{2,4}

¹ Universidad Diego Portales. paulinamartinezg@yahoo.com

² Programa de Salud Ambiental, Instituto de Salud Poblacional ESP, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

³ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

⁴ Departamento de Medicina Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Correspondencia:

Paulina Martínez

Universidad Diego Portales

paulinamartinezg@yahoo.com

En las referencias eliminar la referencia de Television nacional de Chile.

Summary

In Chile, zoonotic diseases with high impact are still present, associated with economic losses and social connotation. Among these diseases we can mention hydatidosis, which is a parasitic anthrozoosis of great importance in the country, which can be absolutely prevented. Hydatidosis is an endemic and hyper-endemic infection that, despite its social and economic connotation, remains a public health problem that has not been fully addressed and therefore remains unresolved.

The reported cases of human hydatidosis have an annual average of 304 cases, while classified deaths have an annual average of about 26.6 deaths. The geographical distribution of hydatidosis is not homogeneous, a higher incidence is described as one moves towards the south. Its distribution is associated with the livestock population, where the regions of Aisén and Magallanes concentrate more than half of the country's sheep farming associated with traditional and extensive management systems with a large canine population. The available evidence confirms that hydatidosis is a preventable disease and considering that the conditioning factors and their form of control are known, in Chile it is feasible to reduce, through access to education, information and participation of the population in the control measures and Prevention in the different risk groups (canine registration, antiparasitic treatment, control of the canine population); Sanitary inspection of slaughter animals and their meat (in application in the slaughtering plants of the country) and strengthening epidemiological surveillance systems.

Introducción

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), existen a nivel mundial enfermedades infecciosas, la mayoría zoonosis, que representan una gran carga social y económica a los afectados, las cuales han sido llamadas las "enfermedades desatendidas" porque no son consideradas problemas de salud pública. Estas enfermedades generalmente no dan emergencias epidemiológicas destacadas por lo cual no llaman la atención de los medios de comunicación y entre los diferentes sectores (Roses 2005).

Estas enfermedades que afectan a los animales y especialmente, las que son transmitidas al hombre, no solo afectan la salud, sino que representan un freno para el desarrollo social y económico, provocando disminución en la producción pecuaria, impacto en ecosistemas, economía, turismo y comercio, en conjunto con la puesta en riesgo de la seguridad alimentaria, particularmente de la población de escasos recursos. Por otra parte, indirectamente generan pérdidas por un bajo rendimiento laboral, morbilidad, impacto negativo en la calidad de vida y en ocasiones defunciones humanas (Martínez 2011).

La complejidad de estas enfermedades esta determinada por los múltiples determinantes que participan en la exposición al agente y posterior desarrollo. Existen determinantes estructurales como el nivel educacional, nivel socioeconómico, patrones antropoculturales, y prácticas de producción agrícolas, que van a impactar en los patrones epidemiológicos y en su distribución. Tienen en común que afectan principalmente zonas o áreas rurales, o localidades con características rurales en las que generalmente el acceso a los servicios de salud por parte de la población es limitado. Por lo tanto, la pobreza juega un rol relevante en los indicadores de incidencia y prevalencia en estas enfermedades (Irabedra & Salvatella 2010).

En Chile, a pesar del importante cambio en el perfil epidemiológico de la carga de enfermedad aún persisten enfermedades zoonóticas, algunas de las cuales con gran impacto debido a su asociación con pérdidas económicas y connotación social. Dentro de estas enfermedades podemos citar la hidatidosis, que es una antrozoosis parasitaria de gran importancia en el país, la cual puede ser absolutamente prevenida. En Chile, la hidatidosis es

una infección de carácter endémico e hiper-endémico que, a pesar de su connotación social y económica, sigue siendo un problema de salud pública no abordado en forma integral y que en consecuencia permanece no resuelto (Martínez 2014).

La enfermedad

Esta enfermedad zoonótica es causada por formas larvianas de varios géneros del parásito de la Clase Cestoda, Orden *Cyclophyllidea*, Familia *Taeniidae*, Género *Echinococcus*. Existen diferentes especies de *Echinococcus*, pero sólo cuatro –*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*– son reconocidas como taxonómicamente relevantes y las cuales son patogénicas para el humano (5).

E. vogeli y *E. oligarthrus* son agentes zoonóticos, cuya infección se denomina equinocosis poliquistica (Roses 2005).

El ciclo de vida del parásito incluye dos hospederos: hospedero definitivo o carnívoro (especialmente el perro), donde los parásitos desarrollan en el intestino la fase adulta o estrobilar; y hospedero intermediario-herbívoro u omnívoro (ovino, caprino, bovino o porcino)- donde se desarrollan las formas larvianas o metacéstode, en los tejidos en forma de quiste (“quiste hidatídico”) especialmente en hígado y pulmón. El hombre se sitúa como hospedero accidental en el grupo de hospedero intermediario (Osorio & Godoy 2008). Los perros eliminan huevos del parásito mediante sus excrementos, los que se diseminan sobre su pelaje y contaminan el medio ambiente. Los hombres ingieren estos huevos al acariciar sus perros y llevarse las manos a la boca o al trabajar en jardines y campos o por la ingestión de verduras o aguas contaminadas con materia fecal canina (Cortés & Valle 2010). Si bien el contagio ocurre a cualquier edad, es más fácil en los primeros años de vida dado los hábitos de los menores de edad que favorecen la ingestión de huevos desde las heces de los hospederos definitivos (Martínez 2014) (Fig.1).

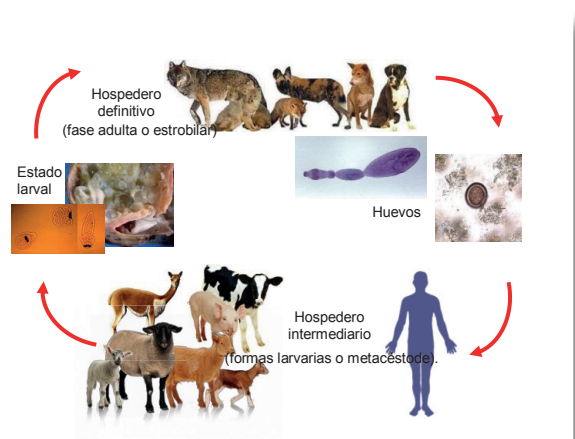


Figura 1. Ciclo de transmisión de *E. granulosus*

Luego, una vez ingeridos los huevos por el ser humano, en el intestino delgado son liberadas las larvas, las cuales penetran la pared, llegando preferentemente al hígado, donde en conjunto con la reacción del hospedero se forman quistes. Adicionalmente, se pueden localizar en otros sitios como pulmones, cerebro, riñón, bazo y otros tejidos, donde finalmente al desarrollarse ejercerán presión sobre ellos y al expandirse pueden inducir atrofia y posteriormente necrosis por presión en los tejidos circundantes (Fig. 2). Durante el curso natural de la enfermedad, la fase del quiste hidatídico es variable. Algunos quistes pueden crecer a un promedio de 1-30 mm por año y pueden pasar muchos años sin transformación. Excepcionalmente, puede producirse una ruptura natural y desaparecer completamente (Menezes da Silva 2010). Por otra parte, una de las complicaciones más frecuentes es la ruptura del quiste, lo que puede desencadenar una reacción anafiláctica y puede conducir a la siembra secundaria y formación de nuevos quistes en las serosas, peritoneo, pleura, etc (Sánchez 2002).

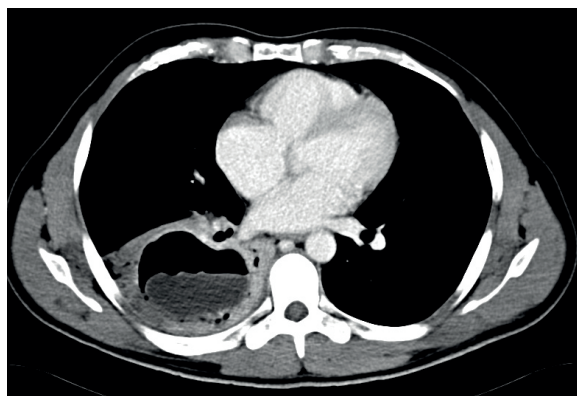


Figura 2.- Quiste hidatídico pulmonar complicado en un hombre joven. Se aprecia en el lóbulo inferior derecho una cavidad con un nivel hidro-aéreo (camalote). Se aprecia la separación entre la adventicia y la cutícula y pequeñas burbujas entre estas capas (neumoperiquiste).

El diagnóstico se basa en datos epidemiológicos, clínicos, radiológicos y de laboratorio (OPS 2004, Canals 2012). Adicionalmente, se ha considerado que la ecografía es una técnica muy importante para el diagnóstico y seguimiento post tratamiento. También se describe que la resonancia magnética sería útil para determinar la viabilidad de los quistes y reconocer su estadio (Amez & Castañeda 2002, Canals 2012). Mientras, la reacción de polimerasa en cadena (PCR) permitiría entregar un diagnóstico definitivo. Ninguna técnica por sí sola otorga un diagnóstico infalible por lo cual es necesaria la complementariedad de técnicas diagnósticas (OPS 2004).

En relación al tratamiento, históricamente, esta enfermedad ha sido considerada de resolución quirúrgica (mediante cirugía abierta o asistida por ecografía), donde se elimina el (los) quiste(s), y se procede a la corrección de sus efectos en el órgano afectado y de las posibles complicaciones (Amez & Castañeda 2002). Hoy se aplica terapia farmacológica a casos inabordables y a las localizaciones abdominales que se pueden controlar por imagenología (Roses 2005).

El tratamiento farmacológico, como por ejemplo la administración de albendazol, a una dosis de 10 mg/kg/día, en una toma diaria luego del desayuno, en ciclos de 30 días, está indicado en portadores

asintomáticos de quistes hidatídicos, principalmente hepáticos, teniendo en cuenta el tipo, tamaño y localización. También en quistes inoperables y como tratamiento pre y post quirúrgico (1).

Epidemiología

En Chile la distribución geográfica de la hidatidosis no es homogénea, se describe una mayor incidencia a medida que se avanza hacia el sur. Su distribución esta asociada a la población ganadera, donde las regiones de Aisén y Magallanes concentran más de la mitad de la ganadería ovina del país asociados a sistemas de explotación tradicionales y extensivos de manejo con una importante población canina (Martinez 2014).

En nuestro país, los casos notificados de hidatidosis humana tienen un promedio anual de 304 casos, mientras las muertes clasificadas según CIE10 (códigos B67.0 a B67.9) tienen un promedio anual cercano a 26,6 defunciones. Estos indicadores a nivel país estiman una tendencia al decrecimiento, sin embargo estos indicadores esconden las realidades regionales, donde no sólo existe una distribución geográfica heterogénea asociada a la economía básica, evidenciada por el aumento de los casos a medida que se avanza hacia el sur, si no también, por las diferencias en la calidad y acceso a las prestaciones de salud (Martinez 2014).

De acuerdo a la distribución regional sin considerar el sexo, las mayores tasas de mortalidad 2000-2010, corresponden a las regiones de La Araucanía (7,64 muertes por 100 mil habts.), Aisén (6,04 defunciones por 100 mil habts.), Los Lagos (3,83 muertes por 100 mil habts.) y Maule (3,72 decesos por 100 mil habts.), sobrepasando la tasa promedio del país (1,8 por 100 mil habts.). En hombres, la distribución regional de las tasas de mortalidad cambia levemente, donde se mantiene la Región de La Araucanía con la mayor tasa de mortalidad (8,46 muertes por 100 mil hombres), seguido por las regiones del Maule (4,14 defunciones por 100 mil hombres), Aisén (3,82 decesos por 100 mil hombres) y Los Lagos (3,77 muertes por 100 mil hombres), todas sobre el promedio para el sexo en el período (2,04 defunciones por 100 mil hombres). En las mujeres, la mayor concentración se registra en la Región de Aisén (8,51 defunciones por 100

¹ Comunicación personal Dr. Jensen, 2014

mil mujeres), luego La Araucanía (6,84 muertes por 100 mil mujeres), Los Lagos (3,88 decesos por 100 mil mujeres) y Maule (3,30 defunciones por 100 mil mujeres), todas sobre el promedio para el sexo en el período (1,57 defunciones por 100 mil mujeres) (Martínez 2014).

Como se ha descrito anteriormente, esta enfermedad es transmitida a cualquier edad y de hecho Martínez (2011), señala que los afectados poseen mayoritariamente entre 30 y 59 años de edad, grupo de edad que se encuentra en plena actividad productiva en términos laborales. Incluso se menciona que es importante considerar que la población chilena está más envejecida, lo cual significa que ha cambiado el índice de dependencia demográfica, por lo cual, al ser menor la proporción de personas en edades laborales, disminuye la oportunidad para incrementar la productividad nacional. Por lo tanto, esta enfermedad está asociada a pérdidas económicas importantes y no sólo a nivel humano sino también a nivel de producción animal (Martínez 2011). Sin embargo, en informe de SEREMI de Salud Aisén se destaca la evolución de esta enfermedad en relación al cambio de patrón epidemiológico, evidenciándose un incremento de la importancia relativa en niños y jóvenes, donde para el año 2009 sobre el 50% de los casos registrados fueron en menores de 20 años. Adicionalmente, este informe también indica que actualmente el diagnóstico de la enfermedad se hace preferentemente en población urbana (PP y CIH 2010).

En relación a la muerte por hidatidosis es posible distinguir y aplicarle el concepto de “muerte evitable”, el cual se ha discutido por décadas y hace referencia a una atención médica efectiva y oportuna, que potencialmente evita muertes prematuras que no deben ocurrir. Por lo tanto, con el conocimiento y la tecnología sanitaria disponible en términos de diagnóstico y tratamiento una proporción importante –sino el total- de muertes por esta causa podrían ser evitadas. A nivel internacional existe estandarización mediante listados de enfermedades en donde la muerte es evitable, en la cual está incluida la hidatidosis. A la vez, una muerte por complicación de la enfermedad, también es evitable dada la existencia de adelantos a nivel quirúrgico, radiológico, inmunológico y farmacológico (SS MEXICO 2006), entre otras. Por lo tanto, la información de mortalidad es importante para entender de mejor manera la carga de enfermedad y

evaluar la efectividad de las intervenciones de salud pública. Consecuentemente, a través de las tasas de mortalidad se puede evaluar la efectividad de las acciones en salud, en términos de acceso, calidad y oportunidad.

El impacto económico y en salud

En Chile, se producen anualmente sobre 300 casos nuevos de hidatidosis que según diferentes estadísticas, ocupan un promedio cercano a 10 días-cama (Olivares 2010). Por otra parte, de acuerdo con los anuarios de egresos hospitalarios del Ministerio de Salud se observa una mejoría de este indicador, explicado por el avance tecnológico en medicina, particularmente en las técnicas quirúrgicas, las cuales en general son menos invasivas, por lo tanto se requiere de menor estadía hospitalaria (Pavletic 2004).

Sin embargo, a pesar de esta reducción del período de hospitalización, el costo por este concepto sigue siendo alto. Así, utilizando los días-camas promedio oficialmente registrados para el año 2008 (14,5 días y 498 egresos hospitalarios), y considerando el valor a 2011, de \$27.900, asignados por FONASA al día cama de los servicios de cirugía de los hospitales tipo uno, en los que se realizan estas intervenciones, se puede estimar en más de 200 millones de pesos el costo que para el sistema de salud pública tiene cada año esta zoonosis, sólo por el concepto de días-cama.⁽²⁾

Según estimaciones del impacto económico de esta enfermedad en nuestro país por Venegas et al (2014) los costos por concepto de prestaciones y exámenes en el sector público son estimados en USD 2.678, a lo cual se le suma los costos por licencias médicas equivalentes a USD 238. Adicionalmente, se estimó el impacto por decomisos de vísceras y pérdida en la producción de carne equivalente a USD 8.699.614.

El costo total fue estimado sumando las pérdidas a nivel humano y animal, lo que dio un valor anual de USD 14,35 millones al 2013 (Venegas et al. 2014).

Por ser una enfermedad que genera alto impacto socioeconómico (días no trabajados, cirugía y recuperación, exámenes, medicamentos, consultas

² Estimación según datos del Arancel FONASA del Régimen de Prestaciones de Salud en la Modalidad de Atención Institucional 2011. Comunicación personal Sr. Pietro Cifuentes, diciembre 2011.

médicas y prestaciones anexas) el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL) incorporó esta enfermedad al sistema de notificación obligatoria y según Acuña et al (2008) es obligatoria desde 1951 (Vidal et al. 1994, Acuña et al. 2008, MINSAL 2004, 2000). Al ser una enfermedad de notificación obligatoria (ENO) y ratificada de acuerdo al Decreto Supremo N°158 ex 712, año 2000, se deben caracterizar epidemiológicamente los casos, forma de presentación y fuentes de infección, de manera de interrumpir la transmisión y desarrollar medidas de prevención y control en humanos. El sistema ENO establece la obligación de notificar diariamente la sospecha de hidatidosis a la autoridad sanitaria regional (MINSAL 2000).

Factores ambientales y socioculturales

Se ha de destacar que la hidatidosis es una enfermedad multifactorial y que en su transmisión tienen importancia varios factores ambientales antropogénicos, los cuales pueden ser influenciados por el comportamiento humano o por eventos naturales. Dentro de estos factores ambientales antropogénicos podemos mencionar: el cambio del uso del suelo, deforestación, cambios en la urbanización, sobrepastoreo y movimiento nacional e internacional de personas, animales, alimentos y mercancías, entre otros. Por otra parte, el potencial impacto de las variables climáticas está referido fundamentalmente a los cambios en temperatura, precipitaciones y humedad, las que actuarían directamente sobre la viabilidad y desarrollo de los huevos en el medio ambiente, e indirectamente sobre la disponibilidad de alimento, lo cual influye en la densidad y distribución de las especies hospederas (Rong et al. 2012).

Jensen (2011) divide los factores involucrados en la dinámica de transmisión en factores extrínsecos, entre ellos temperatura y humedad, agentes dispersores de huevos, envejecimiento de los huevos; factores socio-económicos, destacando las prácticas ganaderas y la legislación; y factores intrínsecos, donde se encuentra el potencial biótico e inmunidad, tanto innata como adquirida.

Dentro de los factores ambientales antropogénicos podemos citar el cambio del uso del suelo relacionado con la urbanización y a la vez interrelacionados con el movimiento de animales, particularmente domésticos, y entre ellos los canidos, hospederos

definitivo del parásito.

Es un hecho público y notorio que la sobrepopulación canina es un problema que afecta a la mayoría de los centros poblados de nuestro país. Donde la ausencia de políticas públicas sobre el tema contribuye a la generación de múltiples consecuencias, que inciden tanto a nivel de salud pública, medio ambiente y/o seguridad ciudadana (Atkinson et al. 2013, Soto 2013).

De hecho, López et al (2012) estima que en Chile existe un perro por cada tres personas, siendo el ideal recomendado uno por cada diez (Fuentealba 2002) y según datos de Ibarra (2003) la población total canina en Chile fluctuaría entre los 2,6 y 3,4 millones de perros y que el 75% de estos animales, pese a poseer un propietario deambulan sin sujeción ni control por las calles y que tan sólo un 25% de esta población no posee domicilio, tenedor ni propietario (Fuentealba 2002, Ibarra & Morales 2003).

En relación a la transmisión de zoonosis, en un estudio en Santiago de Chile, con cerca de mil perros con síntomas diarreicos y con dueños, se identificó que aproximadamente 70% de estos presentaron al menos un parásito y de estos la mitad de los casos se trató de agentes con potencial zoonótico (TVN 2014).

El control

Se ha de recordar que es fundamental en la interrupción del ciclo biológico de este parásito el controlar la fuente de infección en los perros, entendiendo que el perro es la fuente primaria de infección humana en el ciclo de la hidatidosis. Y por lo tanto, el control de los caninos es un punto central a considerar en cualquier programa de control y eliminación de la hidatidosis, para lo cual se ha de recurrir a la intensificación de la tenencia responsable de mascotas, donde se deben incluir herramientas de educación a la comunidad, las que si bien es cierto producen resultados a largo plazo, son fundamentales para alcanzar los cambios de conductas sanitarias necesarias para lograr el control y eliminación de esta enfermedad. La tenencia responsable de mascotas considera la preocupación por aspectos sanitarios y entre ellos se ha de considerar el tratamiento antiparasitario. El tratamiento estándar se inició en 1975 con el tenicida praziquantel a una dosis de 5 mg/kg que permite la

reducción en forma rápida de los perros parasitados con *E. granulosus* y la reducción de la biomasa parasitaria en la población y en el ambiente, donde el intervalo entre desparasitaciones puede ser ajustado localmente, de acuerdo a la tasa de reinfección para cada lugar en particular (OPS 2006). Sin embargo, para lograr disminuciones de la carga parasitaria en perros y consecuentemente reducción del riesgo de infección en el hombre y en el ganado se requiere alcanzar niveles de cobertura efectiva superior al 80% de los perros existentes (Jensen 2011).

La evidencia disponible confirma que la hidatidosis es una enfermedad prevenible y considerando que se conocen los factores condicionantes y su forma de control, en Chile es factible la reducción, mediante acceso a la educación, información y participación de la población en las medidas de control y prevención en los diferentes grupos de riesgo (registro canino, tratamiento antiparasitario, control de población canina); inspección sanitaria de los animales de abasto y sus carnes (en aplicación en las plantas faenadoras del país) y fortalecimiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica (SEREMI Bío-Bío 2014, Troncoso 2000).

En la actualidad se menciona que para un adecuado programa de intervención es necesario primero realizar un "diagnóstico de situación" al inicio y al término del programa. Luego, considerar un sistema de vigilancia integral, el cual debe considerar un sistema de vigilancia en el hospedero intermediario; en el hospedero definitivo (canino); en el ambiente; y vigilancia y tratamiento oportuno en el hombre, incluyendo un sistema de seguimiento y diagnóstico en contactos del paciente, incluyendo el potencial tratamiento. Dentro de las medidas de prevención, se ha de considerar el control de huertas; educación sanitaria y control de la población canina.

Entre las medidas de control se ha de priorizar y mantener un sistema de desparasitación canina cada 45 días con praziquantel a lo menos al 80% de los caninos; vacunación a ovinos, caprinos y bovinos, donde se debe vacunar todos los años con dos dosis corderos, chivitos y terneros, con al menos un intervalo de 30 días. Luego un refuerzo anual (idealmente por 7 años). Adicionalmente, al inicio del programa se debe vacunar con dos dosis con al menos de 30 días de intervalo a todas las madres (SEREMI Bío-Bío 2014).

También es de prioridad considerar el control de fauna, particularmente las domiciliarias, las cuales

han de considerar la cultura asociada a ello y por lo tanto, ya no se considera como recomendación la eliminación, sino que enseñar una adecuada disposición de las vísceras, incluyendo la no entrega a caninos (Troncoso 2000).

En los países de América del Sur, se han desarrollado estrategias de control que han cambiado desde las medidas que apuntaban fundamentalmente a disminuir la infección en el hospedero definitivo, a intervenciones que consideran la prevención de la infección del hospedero intermediario. Si bien, se han logrado disminuciones en la frecuencia de la infección tanto en los hospederos intermediarios como definitivos, el registro de nuevos casos no ha cesado, lo cual refleja que la transmisión no ha sido interrumpida (OPS 2004).

Dentro de la factibilidad del control, se ha de mencionar la existencia de la enfermedad en animales silvestres, lo cual podría suponer un menor riesgo para el humano, debido a que los zorros viven alejados de las zonas pobladas, estancias y puestos patagónicos. Esta situación sin embargo, supone un obstáculo para la erradicación de esta zoonosis, por no ser alcanzado el ciclo silvestre, por la mayoría de las estrategias aplicadas al ciclo doméstico (Jensen 2014).

Un planteamiento actual es que se debe trasladar el foco de visibilización de la enfermedad desde el contexto clínico-quirúrgico hacia el contexto sociocultural, donde la enfermedad forma parte de la cultura local, pero no se visibilizan con claridad ni los contextos de riesgo, ni las conductas riesgosas respecto a la infección. La población afectada tiene la capacidad de percibir el riesgo en términos de áreas, situaciones y conductas, y consecuentemente asumir medidas preventivas. Sin embargo, el resto de la población sigue no percibiendo el riesgo. Luego, se insiste en la necesidad de la existencia de un programa de control permanente de la enfermedad y sus implicancias. La ausencia de medidas sistemáticas de control (desde 2001), ha significado un serio retroceso no sólo en el control de la equinococosis en los animales afectados sino en el fomento de cambios en las formas de pensar y actuar frente a la enfermedad (Osorio & Godoy 2008).



Figura 3. Medidas de prevención y control (Modificado de Jensen O. 2014).

References

- Acuña M, Briceño C, Domínguez M, Montoya L. Hidatidosis uterina: una localización excepcional. *Rev Chilena Obstet Ginecol* 2008; 73(6): 389–392.
- Amez J, Castañeda E. Tratamiento quirúrgico de la hidatidosis pulmonar en el Hospital Nacional Cayetano Heredia 1989-1999. *Revista Médica Heredia* 2002; 13 (1): 3-9.
- Atkinson J, Gray D, Clements A et al. Environmental changes impacting *Echinococcus* transmission: research to support predictive surveillance and control. *Global Change Biology* 2013; 19 677-688.
- Canals M. Rol de la imagenología en el diagnóstico de las parasitosis. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología* 2012; 72(2):152-159.
- Cortés S, Valle C. Hidatidosis humana: Generalidades y situación epidemiológica en Chile según egresos hospitalarios y notificación obligatoria entre los años 2001 y 2005. *Rev Chilena Infectol* 2010; 27 (4): 329-35.
- Fuentealba Y. Comparación de frecuencias serológicas para Hidatidosis animal entre grupos asociados y no asociados a casos de equinococosis canina, IV Región Coquimbo, Chile 2001-2002. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 2002. 73 pp.
- Ibarra, L.; Morales, M.; Cáceres, L. Mordeduras a personas por ataques de perros en la ciudad de Santiago, Chile. *Av Cs Vet* 2003; 18: 41-46.
- Irabedra P, Salvatella R. El Proyecto Subregional Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis. *Revista Peruana Medicina Experimental Salud Pública*. 2010; 27(4): 598-603.
- Jensen O. Hidatidosis en la Patagonia Argentina. Secretaria de salud de Chubut. Argentina, Chubut. 2011.
- Martínez P. Hidatidosis humana: antecedentes generales y situación epidemiológica en Chile, 2001-2009. *Revista Chilena de Infectología* 2011; 28 (6): 585-591.
- Martínez P. Caracterización de la mortalidad por Hidatidosis Humana. Chile, 2000-2010. *Revista Chilena de Infectología* 2014; 31(1).
- Menezes Da Silva A. Human echinococcosis: a neglected disease. *Gastroenterol Res Practice* 2010; 583297
- Ministerio de Salud (MINSAL). Gobierno de Chile.. Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria N° 158. Santiago, 22 de octubre de 2004.
- MINSAL. Normas Técnicas de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles. 2000. <<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/enfransmisibles.pdf>> [Consultado: 19 enero de 2014]
- Olivares M. De qué viven y mueren los chilenos. *El Mercurio*. Chile, 27 junio de 2010. <http://diario.elmercurio.com/detalle/index.asp?id={2541084f-6d0f-4a2c-8c3a-9d2a3c4c17c7}> [Consultado: 10 diciembre de 2013].
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Organización Mundial de la Salud. Informe del Proyecto Subregional Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Primera Reunión Constitutiva. Montevideo, Uruguay, 7 al 9 de julio de 2004.
- OPS. Informe del proyecto subregional cono sur de control y vigilancia de la hidatidosis: Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Tercera Reunión Porto Alegre, Brasil, 23 al 26 de mayo de 2006.
- Osorio M, Godoy H. Estudio “Vulnerabilidad Social Frente a Hidatidosis Humana”. SEREMI de Salud. Región de Aisén. Informe Final Versión 2.0, Marzo 2008. <seremiaysen.redsalud.gob.cl/.../9dada14d3923c7d...> [Consultado: 25 enero de 2014]
- Pavletic C. Chile. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Informe del Proyecto Subregional Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Primera Reunión Constitutiva. Montevideo, Uruguay, 7 al 9 de julio de 2004, pp., 34-38.
- Programa Prevención y Control Intersectorial de Hidatidosis (PP y CIH) en la Región de Aisén 2011-2013. Coihaique, Agosto 2010.
- Rong Y, Clements A, Gray D, Atkinson J et al. Impact of anthropogenic and natural environmental changes on *Echinococcus* transmission in Ningxia Hui Autonomous Region, the Peoples's Republic of China. *Parasites and Vectors* 2012; 5: 146- 154
- Roses M. Las enfermedades desatendidas en las poblaciones postergadas, con énfasis en las zoonosis. Organización Panamericana de la Salud. Informe final y documentos seleccionados. 14ª Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura (RIMSAS 14) Agricultura y Salud: Sinergia para Desarrollo Local Ciudad de México, D.F., México, 21 – 22 de abril de 2005, pp 163-174

Sánchez C. Hidatidosis. Pequeños rumiantes 2002; 3 (2): 9-15

SEREMI Región del Bío Bío/ Servicio de Salud Bío Bío. Seminario "Actualizaciones en Hidatidosis". 26-27 junio de 2014.

Soto A. Análisis de un Problema Público no abordado. El Caso de los perros vagabundos y callejeros en Chile. Tesis para optar al Grado de Magíster en Gestión y Políticas Públicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 2013.

Secretaría de Salud (SS) Gobierno de México. Subsecretaría de Innovación y Calidad. Dirección General de Información en Salud. "La Mortalidad en México, 2000-2004. "Muertes Evitables: magnitud, distribución y tendencias". México, 2006. pp 368.

Troncoso C. Algunas zoonosis de bovinos. Planta faenadora de carnes de Temuco, IX Región, Chile 1990-1999. Temuco, Chile. Universidad de la Frontera, 2000. 39 pp.

Venegas J, Espinoza S, Sánchez G. Estimación del impacto económico de la equinococosis quística en Chile y análisis de las posibles causas que han dificultado su erradicación. Rev. Méd Chile 2014; 142: 1023-1033.

Vidal M, González C, Bonilla C, Jeria E. (1994). Programa de Control de Hidatidosis: el modelo Chileno. Memorias de la reunión del Grupo Científico sobre Avances en la Prevención, Control y Tratamiento de la Hidatidosis. Montevideo, Uruguay.1994: 191-228.

Equinocosis quística: una década de egresos hospitalarios. Resultados preliminares.

HIDALGO A.^{1,2}, BECERRA V.¹, SORIANO C.¹, MELO A.¹, ROMERO F.³,
FONSECA-SALAMANCA F.¹

- ¹ Laboratorio de Inmunoparasitología Molecular-Centro de Excelencia en Medicina Traslacional. Departamento Ciencias Preclínicas. Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. flery.fonseca@ufrontera.cl
- ² Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular Aplicada. Universidad de La Frontera.
- ³ Centro de Neurociencias y Biología de Péptidos. Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera.

Correspondencia:

FLERY R. FONSECA-SALAMANCA

Laboratorio de Inmunoparasitología Molecular-Centro de Excelencia en Medicina Traslacional. Departamento Ciencias Preclínicas. Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera.

Avenida Alemania N° 0458, Casilla 54-D, Temuco – Chile

CP. 481096

E-mail: flery.fonseca@ufrontera.cl

Tel: +56452592147

Fax: +5645 2592139

Financiamiento: Proyecto DIUFRO DI11-0079

Los autores declaran que no existen conflictos de interés

Summary

Cystic echinococcosis is one of the main mandatory disease notification at the country level, and even more so in the Region de La Araucanía, an endemic area with extreme poverty and a high rural population dedicated to cattle raising and sheep farming. With a known underreporting, hospital discharges by cystic echinococcosis, provide valuable information regarding the dynamics of pathology in the short term, age and place of origin of patients, economic costs, among others. **Objective:** To analyze the dynamics of hospital discharges due to echinococcosis at the Hospital Hernán Henríquez Aravena, Temuco from 2005 to 2014. **Results:** The preliminary analysis of our results does not differ much from the national situation. The total hospital discharges for this period was 1092 with an annual average of 109, a mild predominance of 54% in males, with a median age of 34 years and a high number of cystic echinococcosis in children under 15 years (26%). The mean time of hospitalization was 20 days bed, above the national figures. The information collected indicates a mainly rural and Mapuche ethnic population (31%). The main sites were hepatic (46%) and pulmonary (40%). **Conclusions:** The analysis of hospital discharges provides useful information for the evaluation of current programs and gives us an indication of the current situation of hydatidosis in La Araucanía, this preliminary analysis will contribute to the decision making in health and the planning of new strategies for epidemiological surveillance and control of cystic echinococcosis in endemic areas such as the Región de La Araucanía.

Keywords: Cystic echinococcosis, *Echinococcus granulosus*, Hydatidosis, Hospital discharge, Chile.

Introduction

La Equinococosis quística (EQ) o hidatidosis, es una importante zoonosis producida por el estado larvario de cestodos del género *Echinococcus*. De distribución mundial, endémica en Chile, de las cuatro especies reconocidas patógenas en el hombre la EQ es causada por *Echinococcus granulosus*, única especie endémica dentro de los diversos genotipos del complejo *E. granulosus* que han sido identificadas en Chile (Muñoz 2007). Su ciclo de vida involucra huéspedes definitivo e intermediarios, el estado adulto del cestodo tiene hábitat en el intestino delgado de perros que ingirieron vísceras con quistes hidatídicos. Los huevos de la especie *Echinococcus* son eliminados en las heces del perro e infectan vía oral por fecalismo a los hospedadores intermediarios, quienes desarrollan en sus vísceras los quistes hidatídicos (CDC 2016).

De gran importancia en la salud pública de nuestro país, es considerada de alta endemia, principalmente en zonas rurales afectando al ganado bovino y ovino, provocando elevadas pérdidas económicas por el decomiso de vísceras infectadas, donde solo el

decomiso de hígados de bovinos, porcinos y ovinos en 2011 generó pérdidas económicas estimadas en USD 1.449.931 (Venegas et al. 2014)

Incluida dentro de las patologías del “Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria, DS 158/04”, su periodicidad de Notificación Diaria Obligatoria se rige por la Norma Técnica N° 55 sobre “Vigilancia de Enfermedades Transmisibles”, Circular N° 51B/22 del 4/06/2009, Ministerio de Salud (MINSAL 2016)

El Instituto de Salud Pública (ISP), reportó a nivel nacional que entre 1990 y 2005, la incidencia de EQ humana se mantuvo estable, con cifras cercanas a los 2 por cada 100.000 habitantes, con una tendencia al descenso hasta el 2012, con 278 casos reportados (Figura 1), a partir de cuando se ha observado un leve aumento de los casos, 305 en 2013 y 315 en 2014 (DEIS 2016).

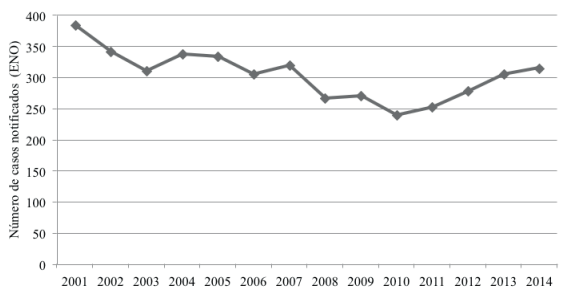


Figura 1. Número de casos de Hidatidosis (equinococosis) notificados en el país, Chile 1950 - 2014*

*Serie histórica 1950 – 2014. Enfermedades de Notificación Obligatoria (ENO). Departamento de Estadísticas e Información en Salud. DEIS. Ministerio de Salud

Los casos humanos, también involucran un fuerte impacto económico, debido a que afecta principalmente a individuos en edad productiva, quienes tienen en promedio licencia médica por EQ de 17 días, lo que involucra, hospitalizaciones, generalmente de resolución quirúrgica, exámenes, pérdida de producción por días no trabajados, recurrencias, entre otras. (Lorca et al. 2003; Venegas et al. 2014). Las principales ubicaciones de los quistes hidatídicos son hepática y pulmonar, frente a las otras localizaciones, alcanzando ambas casi el 90% de las ubicaciones de quistes hidatídicos humanos (Salman et al. 2000; Lorca et al. 2003; MINSAL 2015).

El diagnóstico se basa fundamentalmente en la anamnesis, información clínica y epidemiológica, imagenología (radiología principalmente), bioquímica con transaminasas alteradas y/o hiperbilirrubinemia, hemograma con eosinofilia y mediante la asociación de dos métodos inmunológicos, ELISA y Western Blot (Cortes & Valle 1987; ISP 2016).

El tratamiento es principalmente quirúrgico, hoy en día con procedimientos menos invasivos, eficaces y con múltiples ventajas como el PAIR (Puncture-Aspiration-Injection-Reaspiration) procedimiento de punción, aspiración, inyección de escolicida y re-aspiración (PAIR) (Di Martino et al. 2014; Rajesh et al. 2014). Utilizado de preferencia en niños, disminuye la tasa de complicaciones, mínima invasividad, acortando las estadias hospitalarias y por tanto, generando un tratamiento de menor costo.

A partir de 2015, el Ministerio de Salud implementó el “Manual para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control de la hidatidosis en Chile”, en el cual establece las nuevas directrices técnicas, metodologías y procedimientos para la prevención, control y manejo clínico de la hidatidosis en Chile (MINSAL 2015).

El objetivo del presente estudio descriptivo, fue analizar la dinámica de esta enfermedad a través de los egresos hospitalarios con diagnóstico de EQ en el principal hospital de la región de La Araucanía, donde se resuelven la mayoría de los casos de hidatidosis de la región. El alto grado de ruralidad y pobreza de la región, hace de la hidatidosis una de las patologías de mayor importancia y preocupación en el ámbito de la salud humana, dado que a pesar de las campañas de salud y prevención realizadas, continúa siendo endémica.

Materiales y Métodos.

Se analizaron retrospectivamente los egresos por equinococosis en el Hospital Hernán Henríquez Aravena (HHHA) de Temuco, región de La Araucanía, desde el año 2005 a 2014, utilizando la base de datos del HHA filtrando mediante el código de Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10: Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (A00-B99), Helmintiasis (B65-B83), Equinococosis (B67).

El HHA, ubicado en la comuna de Temuco, provincia de Cautín, Región de La Araucanía, depende administrativamente del Servicio de Salud Araucanía Sur, y es el único establecimiento de Alta Complejidad de la red asistencial de la región, por tanto es donde se resuelven quirúrgicamente, la gran mayoría de los diagnósticos de EQ.

El método de análisis utilizado en los resultados preliminares fue un análisis exploratorio descriptivo.

Resultados.

Se registraron 1092 egresos hospitalarios por equinococosis, con un promedio anual de 109 egresos (Figura 2), fluctuando entre 87 (año 2010) y 140 (2005). La distribución por edad fluctuó entre 2 y 93 años, con un promedio de 34 años. La distribución por sexo fue similar, con 46% del sexo femenino, con un promedio de edad de 33 años y 54% del sexo masculino, con un promedio de edad

de 34 años. Al realizar una distribución por rango etario (Figura 3), 26% de los egresos hospitalarios se concentró en menores de 15 años (281 egresos).

Respecto a la distribución por etnia, de los 1092 egresos hospitalarios, 458 (41,9 %) de los pacientes se declararon parte de pueblos originarios, y de estos 334 (30,5%) de origen mapuche.

La Figura 4 muestra la distribución geográfica por comunas de los egresos hospitalarios.

Respecto a las localizaciones de los quistes hidatídicos, la mayoría de los egresos hospitalarios 501 (46%) presentaron ubicación hepática y 432 (40%) pulmonar, muy por sobre las demás ubicaciones. Cabe hacer notar, que de los 37 egresos por hidatidosis ósea, 34 eran de sexo femenino y los 5 egresos por EQ de localización cerebral correspondió a menores de 5, 10, 11, 13 y 19 años. Los pacientes con quistes hidatídicos hepáticos que presentaron un segundo quiste, resultó ser de ubicación pulmonar y los quiste hidatídicos pulmonares presentaron una segunda ubicación hepática.

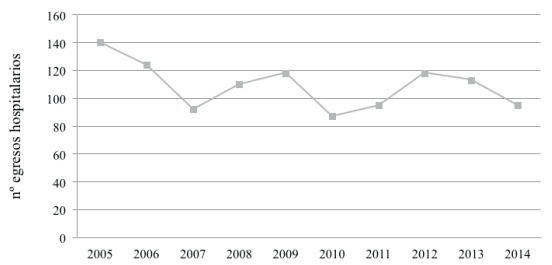


Figura 2. Egresos hospitalarios de equinococosis humana en el Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco, 2005-2014.

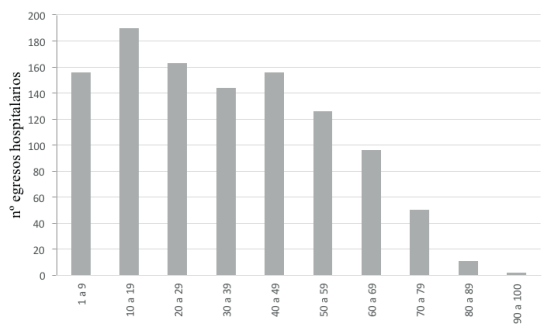
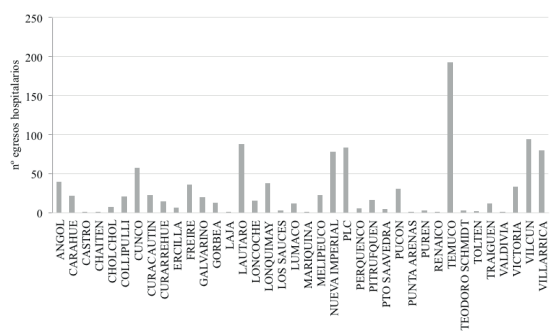


Figura 3. Distribución por grupo etario de los egresos hospitalarios de equinococosis humana en el Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco, 2005-2014.



*(PLC= Padre Las Casas)

Figura 4. Distribución por comunas de los egresos hospitalarios de equinococosis humana en el Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco, 2005-2014.

Al analizar los egresos hospitalarios por paciente, de los 1092 egresos hospitalarios, 580 fueron pacientes que presentaron un solo egreso hospitalario por equinococosis, los 512 egresos restantes correspondían a 206 pacientes que presentaron más de un egreso hospitalario por esta causa, ya sea por una primera hospitalización para estudio y diagnóstico, y posteriores hospitalizaciones para cirugía o a través de los años por una recurrencia o aparición de quiste hidatídico en otra localización. En un análisis más profundo de estos 206 pacientes, los datos indican que 141 pacientes ingresaron dos veces por causas hidatídicas, 50 tres veces, y en el extremo uno con 8 y otro con 15 hospitalizaciones por EQ. En sí, desde un punto de vista de diagnóstico, con o sin resolución quirúrgica, 786 pacientes fueron diagnosticados con EQ.

Del total de egresos, 76% de los pacientes tuvo una resolución quirúrgica, con un promedio de 20 días cama. En este grupo, no se incluyó un paciente con hidatidosis espinal que estuvo 293 días cama, para evitar alterar la media.

Discusión.

La finalidad de este estudio, fue analizar la dinámica del comportamiento de los egresos hospitalarios por equinococosis, en el hospital regional de mayor resolución quirúrgica en La Araucanía, para estimar su comportamiento en esta región endémica, en cuyas comunas más prevalentes se realizan constantemente programas de prevención, desparasitación de caninos y mesas de trabajo con las comunidades.

Al analizar los registros de egresos hospitalarios con diagnóstico de equinocosis, es muy importante para la interpretación de los datos, tener en cuenta que es muy probable que un mismo paciente presente una o más hospitalizaciones por esta causa, ya sea porque se hospitaliza para estudio, ser diagnosticado y es dado de alta para una posterior cirugía, o por tener uno o más quistes hidatídicos en la misma o diferente localización, entre otras razones.

Del mismo modo, se debe considerar la disparidad de los datos debido a la considerable subnotificación que existe entre los casos notificados al ISP y los egresos hospitalarios por equinocosis quística (Cortés & Valle 1987; ISP 2016). El informe epidemiológico de la OPS para Hidatidosis en el periodo 2009-2014, menciona la mayor sensibilidad de los egresos hospitalarios por sobre los casos notificados, con una mayor tasa de incidencia por egresos hospitalarios (4,68 a 5 casos por cien mil habitantes), por sobre la incidencia nacional en base a casos notificados (1,40 a 1,80 por cien mil habitantes) (OPS 2015), dicha discrepancia ha sido informada por diversos autores en distintos periodos estudiados (Rodríguez 2013; ISP 2015; Martínez 2015).

El análisis preliminar de nuestros resultados indican que respecto a la hidatidosis en población adulta, nuestros datos concuerdan con su dinámica a nivel nacional, con una edad fluctuante entre 2 y 93 años, con un promedio de 34 años (en mujeres 33 años y en hombres 34 años), con un leve predominio de hombres respecto a las mujeres como lo muestra la literatura (Serra et al. 1996; Lorca et al. 2003; Martínez 2011; Jans et al. 2012; OPS 2015). Diferente fue el comportamiento en menores de 15 años, donde el 26% encontrado está por sobre el 19,8% de registro de egresos entre 0-18 años de la literatura (Martínez 2015), al 13% en población similar (Fica et al. 2012) o al 15% de los casos registrados en menores de 15 años de edad por la OPS en la Región de América del Sur, 2009-2014 (OPS 2015). Estas cifras indican casos recientes de hidatidosis, por ser niños tienen una baja data de infección, por tanto son indicadores de la persistencia de la infección en el ambiente y refleja falencias en las medidas de prevención y control.

De los egresos hospitalarios filtrados, 41% de los pacientes declaró formar parte de pueblos originarios y de estos 31% de la etnia mapuche. La región de La Araucanía presenta una de las mayores

concentraciones de pueblos originarios mapuche del país, con elevados índices de pobreza y el mayor número absoluto tanto de casos ENO como egresos hospitalarios (Martínez 2014).

Al analizar la distribución por comuna, las principales fueron Temuco, Vilcún, Villarrica, Padre Las Casas, Lautaro, Nueva Imperial y Cunco. Temuco es la capital regional, sin embargo, las demás comunas, dedicadas principalmente al turismo, ganadería ovina, bovina y/o agricultura, tienen una elevada tasa de población rural y de pueblos originarios, datos coincidentes a nivel nacional, donde las mayores tasas de incidencia de EQ se presenta en comunas de economías de subsistencia asociadas a poblaciones de pueblos originarios (OPS 2015). El periodo de incubación de la EQ es variable (12 meses a varios años), y depende del sistema inmunitario y edad del hospedador, genotipo y localización del quiste, llegando a crecer aproximadamente 1 cm/año. Es por ello que la información de origen geográfico de los egresos hospitalarios debe interpretarse con esta consideración, ya que es muy probable que la data de infección sea hace bastantes años, e incluso que se hayan infectado cuando niños, del mismo modo, se debe considerar que la migración de la población entre comunas de la región en la población es baja y por lo general han vivido toda su vida en la región, por ello la información geográfica debe interpretarse a través del tiempo.

El tiempo medio de hospitalización, 20 días cama, está por sobre la media de los registros consultados, que reportan un promedio de 9-17 días (Lorca et al. 2003; Martínez 2011; Jans et al. 2012; Venegas et al. 2014).

Se observó una predominancia de los quistes hidatídicos hepáticos (46%) y pulmonares (40%) por sobre las otras ubicaciones, lo que es coincidente con los autores que reportan 43-50% hepático y 20-40% pulmonar (Cortés & Valle 1987; Salman et al. 2000; Lorca et al. 2003; Fica et al. 2012; Jans et al. 2012; MINSAL 2015).

Conclusiones.

El presente análisis preliminar ya ha sido presentado al Subdepartamento de Zoonosis y Vectores de la SEREMI de Salud Región de La Araucanía gracias a nuestro trabajo colaborativo en la Comisión Regional de Zoonosis, con el fin de contribuir a la Vigilancia Epidemiológica de la EQ

en La Araucanía. El análisis de egresos hospitalarios es una valiosa herramienta que contribuye a la toma de decisiones en salud pública, determinando las áreas de trabajo prioritario, grupo de riesgo en quien concentrar las actividades, la planificación de campañas, estrategias y programas de salud futuros, entre otras. La EQ es una zoonosis que pertenece endémica, y estos resultados preliminares podrán contribuir al control y disminución de la EQ en la región de La Araucanía.

Referencias

- Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Echinococcosis [Internet]. 2016. Disponible en: <http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>
- Cortés S, Valle C. Hidatidosis humana: Generalidades y situación epidemiológica en Chile según egresos hospitalarios y notificación obligatoria entre los años 2001 y 2005. *Rev Chil Infectol.* 2010; 27(4): 329-335.
- DEIS. Serie histórica 1950 – 2014. Enfermedades de Notificación Obligatoria (ENO). Departamento de Estadísticas e Información en Salud. DEIS. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Redes Asistenciales División de Atención Primaria. Vigilancia epidemiológica [Internet]. 2016. Disponible en: <http://www.deis.cl/estadisticas-eno/>
- Di Martíno M, Sánchez L, García I, Salido S, Colmenarejo E, Achalandabaso M, Marín C, Martín-Pérez E. PAIR: Una válida alternativa al tratamiento quirúrgico en la hidatidosis hepática. *Cir Esp.* 2014; 92(Espec Congr):574
- Instituto de Salud Pública, ISP. Parasitología, Exámenes y Formularios, Diagnóstico y Confirmación Serológica de Hidatidosis. [Internet]. 2016. Disponible en: <http://www.ispch.cl/documento/13913>
- Fica A, Soto A, Slater J, Peralta M, Humeres R, Castro M, Gonzalez J, Weitzel T. Quince años de experiencia clínica con hidatidosis. *Rev Chil Infectol.* 2012; 29(2): 183-191.
- Jans J, Bórquez P, Marambio A, Manoli P, Hollstein A, Zarges P. Resultados del tratamiento de la hidatidosis pulmonar complicada y no complicada. *Rev Chil Cir.* 2012; 64(4): 346-351.
- Lorca M, Campanella C, Gavrilovics A, Lagos L, Florín C. Estimación de los costos totales y parciales de diagnóstico, tratamiento quirúrgico y seguimiento de la hidatidosis hepática en el Hospital San Juan de Dios, Santiago, Chile 1990-1999. *Rev Chil Cir.* 2003; 55(1):60-64.
- Martínez P. Hidatidosis humana: antecedentes generales y situación epidemiológica en Chile, 2001-2009. *Rev Chil Infectol.* 2011; 28(6): 585-591.
- Martínez P. Hidatidosis humana en menores de edad: manifestación de fracaso en las medidas de control y prevención. Chile, 2001-2011. *Rev Chil Infectol.* 2015; 32(2): 158-166.
- MINSAL. Subsecretaría de Salud Pública, Ministerio de Salud. Manual para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control de la hidatidosis en Chile. [Internet]. 2015. disponible en: <http://www.aysensinhidatidosis.cl/wp-content/uploads/2016/08/160119-Manual-para-el-diagn%C3%B3stico-tratamiento-prevenci%C3%B3n-y-control-de-la-hidatidosis-en-Chile.pdf>
- MINSAL. Subsecretaría de Redes Asistenciales División de Atención Primaria. Vigilancia epidemiológica [Internet]. 2016. Disponible en: http://web.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/09/5_VIGILANCIA-EPIDEMIOLOGICA-EN-APS.pdf
- Muñoz P. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis (comentario editorial). *Rev Chil Infectol.* 2007; 24 (2): 153-154.
- OPS Organización Panamericana de la Salud. Equinococosis: Informe Epidemiológico de la Situación en la Región de América del Sur Periodo 2009-2014. [Internet]. 2015. Disponible en: http://cdrwww.who.int/echinococcosis/resources/Inf_Epidem_Equinococosis-2009-2014.pdf
- Rajesh R, Dalip D, Anupam J, Jaisiram A. Effectiveness of Puncture-Aspiration-Injection-Reaspiration in the Treatment of Hepatic Hydatid Cysts. *Iran J Radiol.* 2013; 10(2): 68-73.
- Rodríguez B. Situación y evolución temporal de la hidatidosis en Chile 2001-2007. Tesis para optar al grado de Magíster en Salud Pública. Universidad de Chile. Santiago, Chile, 2013.
- Salman J, Meriño G, Silva A, Bahamondes J, Cherres O, Horta J. Hidatidosis intracardiaca. *Rev Chil Cir.* 2000; 52: 285-290.
- Serra I, Araneda J, Araya C, Serra, V. Análisis regional de la hidatidosis humana y animal en Chile. 1989-1993. *Bol Chil Parasitol.* 1996; 51: 3-12.
- Venegas J, Espinoza S, Sánchez G. Estimación del impacto económico de la equinococosis quística en Chile y análisis de las posibles causas que han dificultado su erradicación. *Rev Méd Chile.* 2014; 142(8): 1023-1033.

Dipilidiosis humana en Concepción. Reporte de caso y revisión de claves diagnósticas en el laboratorio.

SUÁREZ-ROA P.¹, MADRID V.¹, FERNÁNDEZ I.¹

¹ Departamento Microbiología. Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. vemadrid@udec.cl

Correspondencia:
Verónica Madrid
Departamento de Microbiología,
Laboratorio de Parasitología.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

Summary

Dipylidium caninum is a zoonotic parasite that causes dipilidiosis. Its common definitive hosts are dogs, cats, wild animal and, accidentally, human beings. The acquisition of this parasitosis involves ingest of arthropod like flea, their carrying inside a cysticeroid larvae. Children are most affecting because their close association with pets and poor hygienic habits. In Chile, 19 cases have been reported to the date, and two were described in Concepcion. We report the identification of *D. caninum* proglotite, and some particular topics in concern to the laboratory diagnostic were reviewed.

Key words: *Dipylidium caninum*, Diagnosis, Zoonoses, Concepción

Introducción

Dipylidium caninum (Cyclophyllidea: Dilepididae) es un céstodo endoparásito cosmopolita que causa dipilidiosis, parasitismo que afecta principalmente tanto a mamíferos domésticos como salvajes y, de forma accidental, al ser humano. La forma adulta, cuyo hábitat es el intestino delgado, se caracteriza por ser blanquecina y presentar una longitud variable de 20 a 70 cm. Su escólex es de aspecto romboidal y se encuentra provisto de 4 ventosas, róstelo retráctil y 3 a 7 coronas de ganchos. Su estróbila consta de una cantidad variable de proglótidas (15 a 150) de forma trapezoidal, en aquellas que se encuentran inmaduras mientras que las grávidas son alargadas, de aspecto de “pepas de zapallo o melón” cuyas medidas relativas son de 1 cm de largo por 0.5 cm de ancho (Vernard 1938, Gállego 2006). El ciclo de vida es heteroxénico y se inicia con el desprendimiento, activo o pasivo, de las proglótidas grávidas, que son expulsadas al ambiente junto con las deposiciones del hospedero definitivo (Vieira et al. 2012). Éstas contienen en su interior los huevos esféricos, de 30 a 40 μm de diámetro, corteza lisa y delgada, y que encierran un embrión hexacanto. Los huevos, a su vez, están incluidos dentro de cápsulas ovígeras que pueden contener hasta 30 unidades (Borchert 1975). Los hospederos intermediarios, habitualmente artrópodos como las pulgas *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis* y *Pulex irritans*, además de piojos como *Trichodectes canis*, se infectan al consumir los huevos de *D. caninum* mientras desarrollan los estadios inmaduros de su metamorfosis. En el interior de estos hospederos los huevos continúan su desarrollo hasta la fase larval o cisticercoide. Hospederos definitivos como

cánidos y félicos se infectan al ingerir el hospedero intermediario cuando lo captura en el proceso de acalamiento. Así, el cisticercoide alcanza el intestino delgado y se desarrolla hasta el estado adulto en un período cercano a un mes (Guzmán 1984, Wani et al. 2015).

El ser humano no es hospedero definitivo habitual en el ciclo (Narasimham et al. 2013), pero puede infectarse al ingerir artrópodos que albergan el cisticercoide. Constituyen factores que favorecen la infección la inadecuada tenencia de mascotas, ejemplificada en la no desparasitación regular y controlada de las mismas, además de la presencia de perros de vida libre y la falta de hábitos de higiene en población infantil, la más comúnmente afectada por este parasitismo (Pacheco 2003, Neira et al. 2008). Hasta la fecha, en Chile se han informado 19 casos de dipilidiosis humana (Neira et al. 2008), dos de ellos en la ciudad de Concepción (Bull & Oyarce 1966). En todos estos reportes los pacientes fueron niños, cuyas edades fluctuaron entre los 4 meses a 4 años y de condición socioeconómica modesta.

Dada la baja prevalencia de esta parasitosis en personas tanto en Chile como en otros países, consideramos de interés comunicar la ocurrencia de un caso de dipilidiosis humana que representó dificultad al diagnóstico de laboratorio.

Materiales y métodos

En diciembre de 2015, se recibió en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, la solicitud de identificación de un espécimen contenido en un frasco con agua potable. La muestra consistía en tres elementos de color blanco de aproximadamente 1 cm

de longitud, que fueron eliminados por una niña de seis años, domiciliada en Coronel, localidad ubicada a 30 Km al sur oeste de la ciudad de Concepción (37°01'00"S; 73°08'00"O).

Para la identificación se procedió a la observación de los elementos con lupa estereoscópica (Carl Zeiss, Stemi DR, aumento de 4x) determinándose la morfología y las dimensiones. Posteriormente, los elementos fueron teñidos con Carmín ácido de Mayer de acuerdo al protocolo señalado por Hanson y Kruse (1982). Brevemente: los elementos fueron colocados en etanol al 70%, luego teñidos con solución de Carmín. El exceso de colorante fue removido en Alcohol-Ácido concentrado (en proporción 100:1). Finalmente, la muestra fue lavada con agua destilada y fijada sobre un portaobjetos con Entellán® (Merck), para su observación mediante microscopio óptico (Motic®, BA 310) con aumento de 40x.

Resultados

Para mayor claridad de descripción, se asignó números de 1 a 3 a cada proglótida. Las observaciones permitieron determinar que estos elementos eran aplanados en sentido dorso ventral, de forma alargada y color blanquecino. Las características morfométricas se resumen en la Tabla 1.

Muestra	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Distancia (mm) Extr. Ant./poro	Distancia (mm) Extr. Post./poro	Presencia de cápsulas ovíferas
Proglótida (1)	10,0	2,0	4,5	5,5	+
Proglótida (2)	8,5	2,0	3,8	4,7	++
Proglótida (3)	7,0	2,5	3,8	3,2	+++

Figura 3. Características morfométricas de las proglótidas examinadas, en relación al grado de madurez

En el extremo proximal de la proglótida 1 se observó una protuberancia que en los otros dos elementos no se visualizaba. El extremo distal era aplanado en todas ellas. Al observar el parénquima se apreció cápsulas ovíferas en un rango desde escasas en la proglótida n°1, a mayor cantidad en la proglótida n°3. Las cápsulas ovíferas se observaron como elementos ovoides de 250 a 300µm, distribuidos irregularmente y sin ocupar la totalidad del espacio interno en las proglótidas. Los huevos, incluidos en el interior de las cápsulas, resultaron ser elementos de forma circular de 40 µm de diámetro. No se observó órganos genitales en ninguna de las proglótidas.

En consideración a estas características y la revisión de literatura de referencia (Vernard 1938, Borchert 1975, Soulsby 1987) se identificó a estas estructuras como proglótidas grávidas de *Dipylidium caninum*.

Discusión

D. caninum es un parásito zoonótico cosmopolita que está ligado principalmente a población canina y felina que carece de control parasitario. Su transmisión depende de la presencia de los hospederos intermediarios en el ambiente los cuales deben ser ingeridos para que el ciclo se reinicie (Gorman et al. 2006, Solana et al. 2014). Estudios efectuados en heces depositadas en áreas públicas de recreación, en diversos lugares de Chile, los porcentajes oscilan entre 2.1 % y 2.65 % (López et al. 2005, Gorman et al. 2006; Luzio et al. 2015). Además, en una investigación similar recientemente finalizada en nuestro laboratorio, en distintos lugares de Concepción (parques, plazas, áreas verdes) no se detectó (datos no publicados).

La dipilidiosis humana afecta principalmente a población pediátrica, siendo el grupo de mayor riesgo los menores de 6 años (Neira et al. 2008). La infección es favorecida por falta de higiene y puede producir en distintas instancias, por ejemplo trituración e ingestión de la pulga infectada, contacto del niño con la mascota que puede tener cisticercoides libres en sus fauces (Reid et al. 1992).

El diagnóstico clínico de esta parasitosis en infantes es difícil, pues suele ser asintomática o cursar con signos inespecíficos, tales como baja de peso, irritabilidad nocturna y picazón de la zona perianal, que suelen confundirse con enterobiosis.

Además, la dipilidiosis suele ser autolimitada por lo cual, el porcentaje de niños afectados puede ser subestimado (Samkari et al. 2008, Narasimham et al. 2013). El diagnóstico de certeza lo constituye el examen parasitológico seriado de deposiciones que permite visualizar principalmente las formas macroscópicas de este céstodo, proglótidas, trozos de estróbila y muy rara vez, el gusano adulto completo. Lo habitual es que el diagnóstico se realice en base a la morfología de las proglótidas grávidas “terminales” es decir aquellas en que todo el parénquima está ocupado por el útero, pues son los segmentos que normalmente el parásito va a eliminar. Por lo mismo es habitual encontrar en los textos las descripciones más completas respecto de ellas. Sin embargo, el hombre al no ser un hospedero habitual de este parásito puede liberar estos elementos con variaciones en algunos aspectos morfológicos. La formación de la estróbila es un proceso dinámico y, por tanto, se producirá gran variabilidad en tamaños, formas y posición de estructuras internas. De esta forma, podemos imaginar que es posible encontrar una “gama de proglótidas grávidas”, es decir, desde aquella que inicia el proceso hasta aquella estructura que está lista para ser eliminada. Por otra parte, al momento de examinar estos elementos en el laboratorio, la morfología de una proglótida grávida se ve influenciada por el grado de contracción, describiéndose como un “grano de arroz” cuando se encuentra contraída y como una “pepa de zapallo” cuando se encuentra relajada.

Las proglótidas encontradas en este caso correspondían al estadio grávido con escasas cápsulas ovíferas. De acuerdo con Vernard (1938), el menor grado de madurez tendría relación con la menor cantidad de cápsulas ovíferas en comparación con una proglótida grávida “terminal”. Por otra parte, la posición del poro varía dependiendo del grado de madurez, por lo que la distancia desde el poro al extremo anterior es menor en una proglótida inmadura, mientras que en la grávida el poro genital se ubica a una distancia equivalente entre el extremo anterior y el posterior. En los elementos examinados las mediciones registradas muestran una tendencia hacia una posición central del poro. Por último, en su estudio Vernard (1938) se refiere al cambio de color de blanco a rojizo, de proglótidas que ha alcanzado su total gravidez. Los especímenes revisados eran de color blanco, lo que también apoya a que provenían de una estróbila aún joven.

Otro aspecto a recordar es la forma de proceder al recibir elementos parasitarios macroscópicos con morfología de céstodos y aún móviles, es importante desvitalizar colocando los ejemplares en agua de la llave o en NaCl al 0,85% y mantener en refrigerador por 2 a 4 horas. También se puede usar mentol ($C_{10}H_{20}O$), para acelerar la relajación y permitir que la estructura permanezca en estado relajado y, de este modo, facilitar su visualización entre dos protaobjetos (García 2007)

Nuestro propósito fue informar de un nuevo caso de dipilidiosis humana en Concepción y de refrescar los procedimientos diagnósticos de esta parasitosis que plantearon dificultad en la determinación taxonómica, al no observar las características morfológicas esperadas en los segmentos del parásito. Concluimos que para el diagnóstico de laboratorio de *D. caninum* es fundamental considerar la presencia de poros genitales bilaterales, la distancia entre éste y el extremo anterior. En el examen del tejido es importante buscar la presencia de cápsulas ovíferas las que no siempre estarán en abundancia. Recordar, además, que la forma y el color son parámetros variables en función del grado de madurez y de la preparación de la muestra.

Referencias

- Borchert A. Parasitología Veterinaria. España: Acribia; 1975.
- Bull F, Oyarce R. Dos casos de Dipilidiasis humana en Concepción. Bol Chil Parasitol. 1966; 21:22.
- Gallego J. Manual de Parasitología: morfología e biología dos parasitos de interesse sanitário. Chapecó, Brasil: Argos; 2006.
- García S.L. Diagnostic Medical Parasitology. Washington DC: ASM Press; 2007.
- Gorman T, Soto A, Alcaino H. Parasitismo gastrointestinal en perros de las comunas de Santiago de diferentes niveles socioeconomicos. Parasitol Latinoam. 2006; 61: 126-132.
- Guzman R.F. A survey of cats and dogs for fleas:with particular reference to their role as intermediate host of *Dipylidium caninum*.1984; NZ Vet J.32:71-73.
- Hanson M.P, Kruse G. The Collection and preservation of animal parasites. Estados Unidos: University of Nebraska press. 1982.
- López J, Abarca K, Paredes P, Inzunza E. Parásitos intestinales en caninos y felinos con cuadros digestivos en Santiago, Chile. Consideraciones en salud pública. Rev Med Chile 2005; 134 (2): 193-200.
- Luzio A, Belmar P, Troncoso I, Luzio P, Jara A, Fernandez I. Formas parasitarias de importancia zoonotica, encontradas en heces de perros recolectadas desde plazas y parques públicos de la ciudad de Los Angeles, región del Bio Bio, Chile. Rev Chilena Infectol 2015; 32 (4): 403-407.
- Narasimham MV, Panda P, Mohanty I, Sahu S, Padhi S, Dash M. *Dipylidium caninum* infection in a child: A rare case report. Indian J Med Microbiol. 2013; 31 :82-4.
- Neira P, Jofré LM, Muñoz NS. Infección por *Dipylidium caninum* en un preescolar. Presentación del caso y revisión de la literatura. Rev Chil Infect. 2008; 25 (6):465-471.
- Pacheco A. Mascotas en los hogares: enfermedades de los niños adquiridas por convivencia con animales. Enf Infec Microbiol. 2003 ;23(4):137-48.
- Reid CJD, Perry FM, Evans N. *Dipylidium caninum* in an infant. Eur J Pediatr.1992; 151 : 502-503.
- Samkari A, Kiska D.L, Riddell S.W, Wilson K, Weiner L.B, Domachowske J.B. *Dipylidium caninum* mimicking recurrent (pinworm) infection. Clin Pediatr. 2008; 47(4):397-9.
- Solana C, Garcia del Valle M, Saez L, Soliz J. Infecciones por cestodos. 2014; Medicine; 11(53):3099-114.
- Soulsby, EJ. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Nueva Editorial Interamericana; 1987.
- Vernard CE. Morphology, Bionomics and Taxonomy of the cestode *Dipylidium caninum*. Ann NY Acad Sci. 1938; 37: 273 -328.
- Vieira FM, Luque J.L, Lima S.deS, Neto A.H, Muniz-Pereira L.C.*Dipylidium caninum* (Cyclophyllidea, Dipylidiidae) in a wild carnivore from Brazil. J Wild Dis. 2012; 48(1):233-234.
- Wani Z.A, Allaje I.M, Shah B.M, Raies A, Athar H, Junaid S. *Dipylidium caninum* infection in dogs infest with fleas. J Parasit Dis 2015; 39(1):73-75.

Supervivencia de *Giardia duodenalis* en agua de mar, de río y subterránea a temperaturas ambientales.

MODINI LB. ¹, SOFFIETTI J. ¹, PIZARRO AV. ¹, VAIRA S. ², ZERBATTO MG. ¹

¹ Departamento de Ciencias Biológicas.

² Departamento de Matemática, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Correspondencia:

Laura Beatriz Modini. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional del Litoral, Ruta Nac N° 168, Km 472. CC 242. CPA S3000ZAA. Santa Fe, Argentina.
e-mail. lmodini@fcb.unl.edu.ar

Summary

Giardia has been associated with waterborne outbreaks in many countries. Worldwide, *Giardia* cysts have been found in all natural waters. The survival of cysts in river water, artificial seawater (salinity: 35 ppt) and groundwater was investigated. *Giardia duodenalis* cysts obtained from human feces were concentrated by the Sheather's method. The prepared suspension of cysts (10^5 cysts/ml H_2O_d) was inoculated into tubes containing (I) river water to 6, 15, 20 and 32 °C, (II) salt water to 15 and 20 °C and (III) groundwater at 20 °C and incubated for 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days. Cyst viability was assessed by the technique of vital dye exclusion using 1 % eosin. A significant increase ($p < 0.001$) in the percentage of dead cysts with increasing temperature was found. At 20 °C the cysts survived longer in groundwater and inactivated faster in seawater, finding it a significant interaction ($p < 0.001$) between the type of water and the time of exposition. At lower temperatures (6 - 15 °C), the coefficients of inactivation in river and salt water were similar ($0.021 - 0.030 d^{-1}$). Since the cysts can survive in water for long time, especially at cold temperatures, the importance of protecting and controlling water sources is emphasized

Keywords: : *Giardia*, viability, sea, river, groundwater

Introducción

Giardia es un enteroparásito protozoario de distribución cosmopolita que ha sido asociado con brotes de origen hídrico en numerosos países. *Giardia duodenalis*, la especie que infecta al hombre, comprende 8 genotipos, algunos de los cuales son zoonóticos y otros huésped específico (Feng & Xiao 2011). En humanos se han aislado los genotipos zoonóticos A y B que también infectan a un amplio rango de mamíferos silvestres y domésticos como perros, gatos y ganado (Ryan & Cacciò 2013). El parásito produce quistes ambientalmente resistentes que se eliminan en gran número con las heces e iniciarán la infección si son ingeridos por otro huésped (Thompson 2008). La infección puede ser asintomática o presentarse como una diarrea aguda o crónica que puede estar asociada con malabsorción de nutrientes (Lujan 2006).

En 2004, la Organización Mundial de la Salud incluyó esta parasitosis en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas debido a su vínculo común con la pobreza (Savioli et al. 2006). En los países industrializados la prevalencia de la enfermedad es del 2 al 7 %, mientras en los países subdesarrollados, puede superar el 40 % (Barbosa et al. 2013). En estudios llevados a cabo en distintas áreas y grupos de población en Argentina, la

prevalencia de infección por *Giardia* varió desde 6 hasta 36 % (Molina et al. 2011).

La giardiosis es la enfermedad de transmisión hídrica más frecuentemente diagnosticada y constituye un importante problema de salud pública global (Lujan 2006, Thompson 2008). Entre 2004 y 2010, se reportaron 199 brotes hídricos de parásitos protozoarios en todo el mundo, de los cuales, *Giardia* fue el agente etiológico en el 35,1 % (Baldursson & Karanis 2011). Las causas incluyeron agua de red contaminada, suministros de agua no tratada, fallas en el proceso de tratamiento, contaminación de fuentes de agua y agua recreacional.

Los quistes de *Giardia* están ampliamente distribuidos en los ecosistemas acuáticos. A nivel mundial, su presencia se ha detectado tanto en aguas dulces superficiales como subterráneas (Castro-Hermida et al. 2010, Pitkänen et al. 2015). Otras investigaciones indican que *Giardia* también se encuentra en aguas costeras y que puede infectar mamíferos marinos (Betancourt et al. 2014, Delpont et al. 2014). En diversas provincias de Argentina se informó la presencia de este parásito en aguas superficiales utilizadas para recreación y como fuente de agua potable y en aguas de consumo de origen subterráneo (Lurá et al. 2000, Abramovich et al. 2001, Costamagna et al. 2005, Poma et al. 2012). La transmisión hídrica de *Giardia* se ve favorecida

por la baja dosis infectante, la existencia de animales que actúan como reservorios y la elevada resistencia de los quistes a las condiciones ambientales y a la desinfección convencional del agua de bebida (Slifko et al. 2000, Zerbato & Abramovich 2016).

Dentro del ambiente acuático, los factores que pueden tener un efecto sobre la persistencia de los quistes son diversos: exposición a la luz solar, temperatura, pH, presencia de organismos predadores, etc. (Pedley et al. 2006, World Health Organization 2016). Asimismo, según su procedencia, el agua posee distintas características físicas, químicas y biológicas, lo cual permite plantear la posibilidad que influyan de manera diferente sobre la viabilidad de los quistes.

Dada la importancia sanitaria que constituye el agua para todos los seres vivos, además de ser un elemento constitutivo de los lugares de recreación, se torna indispensable estudiar todos los factores que pueden influir en la transmisión de enfermedades hídricas. Pese a que muchos estudios demuestran que *Giardia* está presente habitualmente en aguas naturales, continúa habiendo poca información disponible sobre la longevidad de este parásito en ambientes acuáticos. En este trabajo se propuso investigar la supervivencia de quistes de *Giardia duodenalis* en aguas de distinto origen a temperaturas ambientales.

Materiales y métodos

Obtención de muestras de materia fecal de humanos infectados con *Giardia*. Preparación de la suspensión de quistes: Las muestras de materia fecal humana con quistes de *Giardia duodenalis* fueron aportadas por laboratorios de Hospitales de la ciudad de Santa Fe (Argentina). Se prepararon suspensiones en agua destilada del orden de 10⁵ quistes/ml. Para ello, las heces sin formol se filtraron a través de gasa doble, se lavaron con solución fisiológica por centrifugación y se concentraron por el método de flotación con centrifugación (centrífuga Rolco®, Argentina) en solución saturada de sacarosa sin agregado de fenol (densidad a 15 °C: 1300 kg/m³). Para estimar la concentración obtenida, los quistes se contaron en cámara de Neubauer (Brand®, Alemania) empleando microscopio óptico (Arcano®, China) con aumentos de 100X y 400X. La identificación se realizó teniendo en cuenta el tamaño y características morfológicas (García 2009).

Procedencia de las muestras de agua

-Agua subterránea: Se extrajo del pozo de una vivienda particular ubicada en la localidad de Arroyo Leyes (Provincia de Santa Fe, Argentina).

-Agua de mar: Debido a la lejanía de la unidad ejecutora con el mar, se sintetizó artificialmente en el laboratorio mediante el agregado de distintas sales al agua destilada (NaCl: 24 g/l, MgCl₂: 5 g/l, NaSO₄: 4 g/l, CaCl₂.6H₂O: 2,2 g/l, KCl: 0,7 g/l, NaHCO₃.6H₂O: 0,457 g/l, NaBr: 0,096 g/l, H₃BO₃: 0,026 g/l, NaF: 0,003 g/l) en una proporción aproximada de 35 g/l (Cifuentes et al. 2002). Las sales usadas eran de calidad pro-análisis (Cicarelli®, Argentina). El pH final del agua salada fue 8,2.

-Agua de río: Se emplearon muestras provenientes de la laguna Setúbal de la ciudad de Santa Fe (Provincia de Santa Fe, Argentina). La laguna se utiliza para fines recreativos y como fuente de agua para potabilización.

Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras de agua subterránea y de río:

Se midieron distintos parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos para caracterizar el agua de las muestras de río y de pozo (Tabla 1).

Parámetro	Método*	Agua de río	Agua subterránea
pH (Temperatura °C)	4500-H ⁺ B	7,40 (17,5)	6,44 (20)
Turbiedad (UNT)	2130 B	25,5	0,5
Sólidos disueltos (mg/l)	2540 C	72	255
Cloruro (mg/l)	4500-Cl ⁻ C	4,3	17,6
Sodio (mg/l)	3500-Na B	21,8	46,0
Recuento de Heterótrofos en Placa (UFC/ml)	9215 B	NE	35
Coliformes Totales (NMP/100 ml)	9221 B	280	< a 2
Coliformes Termotolerantes (NMP/100 ml)	9221 B	43	< a 2
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)	9223 B	43	< a 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Presencia/Ausencia en 50 ml)	9213 F	NE	Ausencia

*Según Standard Methods 22nd edition

NE: No ensayado

Tabla 1. Características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua dulce superficial y subterránea empleadas en los ensayos.

Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las técnicas de Standard Methods (2012). El pH se midió con un peachímetro (Hanna®, Portugal) y la turbiedad en un turbidímetro nefelométrico (AV-311, Argentina). El agua subterránea era apta para bebida de acuerdo con el Código Alimentario Argentino (2012).

Diseño de las experiencias: Alícuotas (5 ml) de cada muestra de agua se colocaron en tubos para centrifuga y se inocularon con 500 ul de la suspensión de quistes cuya viabilidad se determinó previamente. Luego se sometieron a la acción de distintas temperaturas: (I) agua subterránea a 20 °C, (II) agua de mar a 15 y 20 °C y (III) agua de río a 6, 15, 20 y 32 °C. Las muestras inoculadas fueron mantenidas en oscuridad a las temperaturas correspondientes y protegidas de la evaporación tapando la boca de los tubos. Periódicamente, los tubos se agitaban para resuspender los quistes. Después de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 d de incubación, los quistes fueron recuperados por centrifugación (3000 rpm, 10 m). El sedimento obtenido se resuspendió en 500 ul del sobrenadante y se evaluó su viabilidad. Para el ensayo en agua de río a 32 °C, la viabilidad se comprobó cada 2 h durante las primeras 12 h de prueba. Luego se hizo una comprobación a las 24 h y otra a las 48 h y se continuó cada 2 d hasta completar las 2 semanas de tratamiento. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La elección de las temperaturas se realizó de acuerdo a la procedencia del agua:

-**Agua subterránea:** Se midió la temperatura en el sitio de extracción.

-**Agua de mar:** Las temperaturas de ensayo se fijaron teniendo en cuenta la temperatura del agua en la Costa Atlántica Argentina durante la época estival, que se corresponde con una mayor frecuencia de uso recreativo del agua (Servicio de Hidrografía Naval, 2014).

-**Agua de río:** Se seleccionaron sobre la base de datos de temperatura del agua de la laguna Setúbal registrados por este grupo de investigación (Modini et al. 2009).

Evaluación de la viabilidad: La viabilidad de *Giardia* se evaluó con la técnica de exclusión

de colorante vital utilizando eosina (Castellón et al. 1992). Este método se basa en los cambios de permeabilidad de la pared del quiste al colorante. Los quistes no viables son permeables al mismo y adquieren una coloración rosa, mientras que los viables no se tiñen. Para este procedimiento, 45 µl de la suspensión de quistes recuperada de cada tubo de muestra se incubó con 5 µl de una solución acuosa de eosina al 10 % durante 30 s. Luego se colocaron 15 µl del preparado entre porta y cubre objeto y se observó con microscopio óptico (100X y 400X). El porcentaje de viabilidad se calculó contando 200 quistes y discriminando entre viables y no viables. Todos los recuentos se realizaron por triplicado.

Análisis de datos: Se realizó un modelo longitudinal de Medidas Repetidas (MR). Al contrastar la presencia de interacción tiempo-grupo (agua*temperatura), las comparaciones entre grupos se realizaron con un análisis de variancia univariada para cada uno de los tiempos (corte transversal) y como comparación a posteriori se eligió el test de Bonferroni (Liang & Zeger 1986, Lindsey 2001).

La tasa de inactivación de quistes en cada tipo de agua se determinó a través de una ecuación cinética de primer orden (Ecuación 1) (Kato et al. 2004):

$$V_t = V_0 \cdot e^{-kt} \text{ ecuación 1}$$

donde V_t es el porcentaje de quistes viables al tiempo t , V_0 representa el porcentaje inicial de viabilidad, k es el coeficiente de inactivación y t es el tiempo en días. A partir de la ecuación 1, los k (d^{-1}) se calcularon por regresión [$\ln(V_t/V_0)$ vs. t] y se compararon mediante análisis de regresión lineal simple con la incorporación de una variable Dummy.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software SPSS BeSmart (21.0). El nivel de significación adoptado fue $\alpha = 0,05$.

Resultados

Supervivencia de *Giardia* en agua de río a distintas temperaturas:

En la figura 1 se muestran los perfiles de viabilidad de quistes de *G. duodenalis* en agua de río a las distintas temperaturas. La viabilidad de los quistes disminuyó significativamente durante el período de prueba ($F_{6,36} = 676,1$; $p < 0,001$). La interacción entre el tiempo de exposición y la temperatura del

agua resultó significativa. Hasta el día 7, la viabilidad en agua de río a las tres temperaturas fue similar. A partir del día 14, la viabilidad a 20 °C resultó inferior con respecto a las otras dos temperaturas (mínima diferencia entre medias = 18,2; $p \leq 0,002$). La supervivencia de los quistes a 6 y 15 °C no mostró diferencia significativa con excepción de los días 14 y 21, en los cuales se computaron más quistes viables a 15 °C. Se destaca que durante el examen microscópico en agua de río a 20 °C se observó una variedad de microorganismos, fundamentalmente protozoos, cuyo número aumentó con el tiempo de exposición, presentado un máximo en la segunda semana para luego disminuir gradualmente.

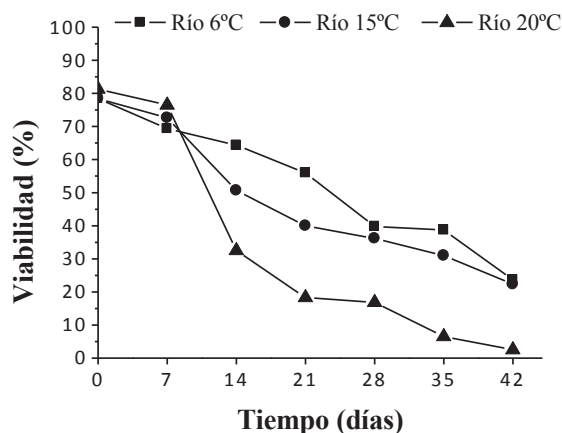


Figura 1. Perfiles de viabilidad de quistes de *G. duodenalis* en agua de río a distintas temperaturas (6°C, 15°C, 20°C) representando el efecto de la interacción tiempo-temperatura del agua.

La viabilidad en agua de río a 32 °C se analizó en forma separada. La supervivencia de los quistes expuestos a estas condiciones se redujo significativamente ($F_{9,18} = 667,3$; $p < 0,001$). A los 14 d, sólo el $4,50 \pm 1,61$ % (Media \pm Desviación Estándar) de los quistes continuaba viable.

Supervivencia de Giardia en agua de mar a diferentes temperaturas:

El efecto de la temperatura del agua sobre la viabilidad de quistes de *G. duodenalis* depositados en agua marina se presenta en la figura 2.

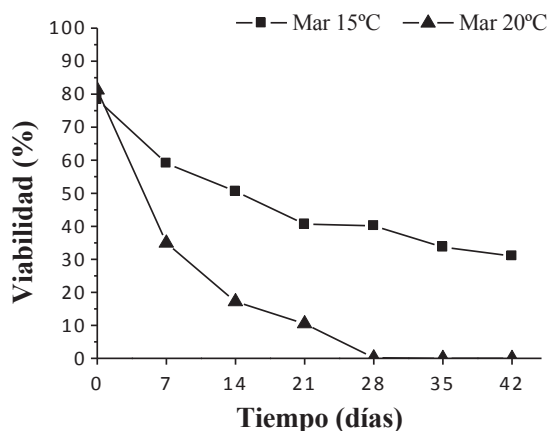


Figura 2. Perfiles de viabilidad de quistes de *G. duodenalis* en agua de mar a 15 y 20°C representando el efecto de la interacción tiempo-temperatura agua de mar.

La viabilidad de los quistes disminuyó significativamente durante el tiempo de exposición, siendo menor en agua salada a 20 °C en comparación a 15 °C ($F_{1,4} = 5479,4$; $p < 0,001$). No se encontraron quistes viables de *Giardia* en agua salada a los 35 d de exposición a 20°C. La interacción tiempo-temperatura del agua fue significativa ($F_{6,24} = 80,4$; $p < 0,001$).

Asimismo, durante la observación microscópica los quistes presentaron el citoplasma contraído debido a la salida de agua hacia el agua marina hipertónica (Figura 3).

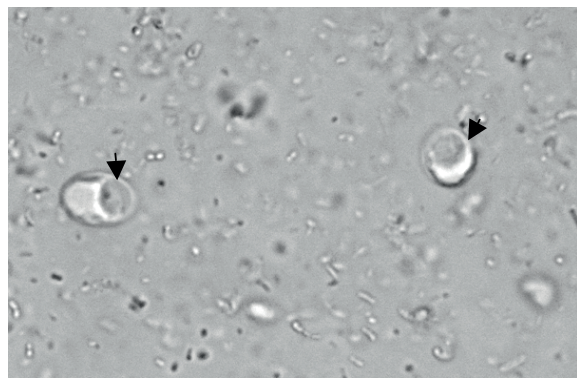


Figura 3. Quistes de *G. duodenalis* en agua de mar. El citoplasma se encuentra contraído debido al proceso de plasmólisis.

Comparación de viabilidad de *Giardia* en agua de mar, de río y subterránea a 20 °C:

En la figura 4 se representa la evolución temporal de la viabilidad de quistes de *G. duodenalis* en agua salada, de río y subterránea a 20 °C. La viabilidad de los quistes disminuyó significativamente con el tiempo. La supervivencia en agua de pozo fue la más alta, mientras la menor se halló en agua de mar ($F_{2,6} = 2034,0$; $p < 0,001$; mínima diferencia entre medias = 6,7). Además, se encontró una interacción significativa ($F_{12,36} = 154,9$; $p < 0,001$) entre el tiempo y el tipo de agua.

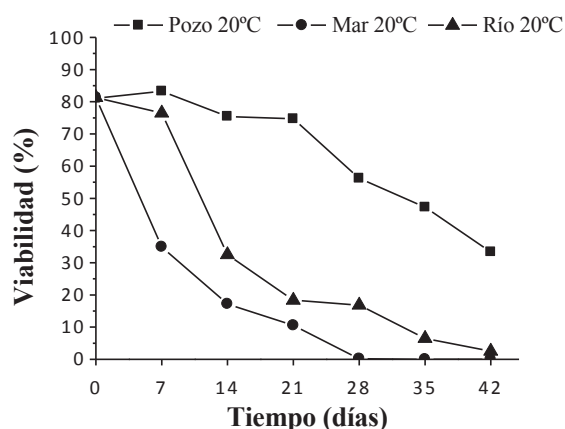


Figura 4. Perfiles de viabilidad de quistes de *G. duodenalis* en aguas de distinta procedencia (subterránea, mar y río) a 20°C representando el efecto de la interacción entre el tiempo y el tipo de agua.

Comparación de viabilidad de *Giardia* en agua de mar y de río a 15 °C:

No se hallaron diferencias significativas ($F_{1,4} = 0,2$; $p = 0,695$) entre la viabilidad de los quistes de este parásito en agua salada y de río a 15 °C.

Tasa de inactivación de quistes:

En la tabla 2 se presentan los coeficientes de inactivación de quistes de *Giardia* en cada tipo de agua. A temperaturas bajas (6 - 15 °C), la tasa de pérdida de viabilidad en agua salada y de río fue similar ($0,021 < k^{d^{-1}} < 0,030$).

Tipo de Agua	T °C	n	k* (ES) d ⁻¹
subterránea	20	21	0,021 ^a (0,0020)
río	32	33	0,206 ^b (0,0151)
río	20	21	0,083 ^c (0,0053)
río	15	21	0,030 ^d (0,0014)
río	6	21	0,027 ^a (0,0020)
mar	20	13	0,163 ^b (0,0181)
mar	15	21	0,021 ^a (0,0013)

T: Temperatura k: coeficiente de inactivación ES: Error estándar

*R ≥ 0,9127, p < 0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas entre k (p < 0,05)

Tabla 2. Tasas de inactivación de quistes de *Giardia duodenalis* en agua subterránea, de río y de mar.

Discusión

La temperatura (T) tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad de *Giardia* en agua. Las temperaturas altas favorecieron o aceleraron la inactivación de los quistes; mientras que a temperaturas más bajas los quistes permanecieron viables por más tiempo. Este resultado es coincidente con lo reportado por otras investigaciones (Bingham et al. 1979, DeRegnier et al. 1989, Castellón et al. 1992).

En el presente trabajo se halló que el 23,67 ± 3,05 % ($V_0 = 78,43 \pm 1,24$ %) de los quistes de *G. duodenalis* suspendidos en agua de río a 6 °C continuaba viable a los 42 d de ensayo, mientras que a 20 °C, la viabilidad se redujo a 2,50 ± 1,32 % ($V_0 = 81,33 \pm 1,26$ %). DeRegnier et al. (1989) evaluaron la viabilidad de quistes de *Giardia muris* ($V_0 \sim 95$ %) suspendidos en agua de río durante 2 estaciones diferentes del año (otoño e invierno). Estos investigadores reportaron que los quistes de *G. muris* (usada como modelo para la supervivencia de *G. duodenalis*) sobrevivieron entre 56 y 84 d en agua de río durante el invierno ($0 < T \text{ °C} < 2$); mientras que en otoño ($19 < T \text{ °C} < 27$) no se hallaron quistes viables a los 28 d de exposición. Conjuntamente con la temperatura, DeRegnier et al. (1989) monitorearon otros parámetros fisicoquímicos del agua de río como pH, oxígeno disuelto, turbiedad, color y dureza. Pese a que estos parámetros fluctuaron ampliamente entre ambas estaciones, solamente la temperatura del agua tuvo una correlación aparente con la viabilidad de

los quistes. En otro estudio, Robertson et al. (2006) encontraron que la supervivencia en agua de río de quistes de *Giardia* aislados de terneros fue de 29 días ($V_0 \sim 100\%$), con temperaturas que variaron entre 1,1 y 7,3 °C. Los resultados de estos autores sugieren que en estas condiciones ni la fluctuación de temperatura ni otros factores físicos o biológicos en el ambiente fluvial afectó la tasa de pérdida de viabilidad de *Giardia*. En la presente investigación, no se hallaron diferencias entre los coeficientes de inactivación en agua de río a 6 y a 15 °C. En cambio, a temperaturas entre 20 y 32 °C, los quistes se inactivaron más rápidamente conforme aumentó la temperatura. Esto podría correlacionarse con un incremento de la actividad bioquímica o biológica a temperaturas elevadas.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos en agua de mar, la viabilidad de los quistes a los 28 d de exposición a 20 °C fue inferior a 0,50 % ($V_0 = 81,33 \pm 1,26\%$), mientras que a 15 °C y luego de 42 d todavía permanecía viable el $31,00 \pm 1,50\%$ ($V_0 = 78,43 \pm 1,24\%$). Dado que este estudio es un ensayo de laboratorio en donde se trabajó con agua de mar artificial, otros factores ambientales como la radiación solar y la calidad microbiológica del agua no fueron analizados. Sin embargo, Johnson et al. (1997), quienes investigaron la supervivencia de *G. muris* en agua marina natural ($T = 23 - 25\text{ °C}$), no hallaron diferencia significativa en la inactivación de los quistes en agua salada estéril (por filtración o autoclavado) y no estéril, sosteniendo la hipótesis de que la salinidad fue más responsable de su inactivación y no un antagonismo microbiano.

Con respecto a los ensayos en agua de pozo a 20 °C, se encontró que el $33,36 \pm 0,92\%$ ($V_0 = 81,06 \pm 3,21\%$) de los quistes continuaba viable a los 42 d de iniciado el tratamiento. No se hallaron trabajos similares en agua subterránea pese a la evidencia epidemiológica que prueba la transmisión de este parásito a través de esta vía (Abramovich et al. 1997). En un estudio sobre el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de *Giardia* spp. en agua potable declorada (pH: 6,8), los quistes incubados a 21 °C retuvieron su viabilidad por aproximadamente 31 d ($V_0 > 90\%$) (Bingham et al. 1979). A 8 °C, la supervivencia fue superior a 77 d, con más de 80 % de viabilidad ($V_0 > 90\%$). Por otro lado, los quistes depositados a 37 °C sobrevivieron sólo hasta 4 días ($V_0 \sim 55\%$).

Continuando con esta investigación, se comparó la viabilidad de los quistes en los tres tipos de agua a 20 °C. Se encontró que los parásitos permanecieron viables más tiempo en agua subterránea y se inactivaron más rápido en agua de mar. La mayor longevidad en agua subterránea a 20 °C podría explicarse por su buena calidad bacteriológica, apta para consumo humano. Si bien los parámetros biológicos no fueron determinados, la observación en el agua de río a 20 °C de microorganismos planctónicos que actuarían como predadores, pudo afectar la tasa de inactivación de los quistes. Connelly et al. (2007) demostraron que *Daphnia pulex* disminuye la viabilidad de los quistes de *Giardia lamblia* durante el pastoreo en sistemas de agua dulce. El mecanismo propuesto fue que la digestión mecánica y posterior excreción, probablemente con ingestión repetida, interrumpe la integridad de la pared quística. Por otro lado, los quistes sobrevivieron menos tiempo en el agua de mar sugiriendo que el efecto negativo de las sales sobre la viabilidad de *Giardia* resultó más letal que el aumento de la actividad microbiana observado a 20 °C.

Johnson et al. (1997) hallaron que la supervivencia de *Giardia* varía de acuerdo a la salinidad del agua. En su investigación, los quistes en agua con 35 g/l de salinidad fueron inactivados más rápidamente que aquellos suspendidos en agua con menor concentración de sal (28 g/l) y en *buffer* fosfato salino (8 g/l). No obstante, en el presente estudio, el tiempo de supervivencia de los quistes en agua de río y de mar a 15 °C fue similar. Es probable que el efecto de la salinidad señalado por Johnson et al. (1997) se manifieste principalmente a temperaturas elevadas ($\geq 20\text{ °C}$), que causan más daño al quiste haciéndolo más sensible a la acción de las sales.

Los resultados de este trabajo muestran que la viabilidad de los quistes de *G. duodenalis* decrece en el tiempo dependiendo de las características y la temperatura del agua. Pero además, la interacción entre estos factores juega un rol significativo en la supervivencia de los quistes de este parásito en agua.

Dado que los quistes pueden sobrevivir en el agua por largos periodos de tiempo, sobre todo a temperaturas frías, se recalca la importancia de proteger y controlar las fuentes de agua destinadas al consumo y la recreación.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el marco de los proyectos CAI+D 2011 que financia la Universidad Nacional del Litoral. Se agradece al personal del laboratorio (Sección Parasitología) de los Hospitales J.M Cullen y Orlando Alassia por su colaboración en la obtención de muestras.

Referencias

- Abramovich BL, Carrera E, Lurá MC, Haye MA, Zamar L, Gilli MI et al. Transmisión hídrica de giardiasis en áreas endémicas de parasitosis intestinales. FABICIB. 1997; 1: 9-15.
- Abramovich BL, Gilli MI, Haye MA, Carrera E; Lura MC, Nepote A et al. *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas superficiales. Rev Argent Microbiol. 2001; 33: 167-176.
- Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks-An update 2004-2010. Water Res. 2011; 45: 6603-6614.
- Barbosa J, Espinar M; Gonçalves Rodrigues A. Pina-Vaz, C. *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* and *Encephalitozoon intestinalis* emergent opportunists. Bol Mal Salud Amb. 2013; 53(2): 117-124.
- Betancourt WQ, Duarte DC, Vásquez RC, Gurian PL. *Cryptosporidium* and *Giardia* in tropical recreational marine waters contaminated with domestic sewage: Estimation of bathing-associated disease risks. Mar Pollut Bull. 2014; 85(1): 268-273.
- Bingham AK, Jarroll Jr EL, Meyer EA. Induction de *Giardia* sp.: Physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. Exp Parasitol. 1979; 47(2): 284-291.
- Castellón A, Reyes L; Chinchilla M, Mora D. Viabilidad de los quistes de *Lamblia intestinalis* bajo diferentes condiciones. Rev Costarric Cienc Med. 1992; 13(1-2): 9-15.
- Castro-Hermida JA, García-Preledo I, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. Water Res. 2010; 44: 5887-5896.
- Cifuentes Lemus JL, Torres García M, Frías M. El océano y sus recursos. II. Las ciencias del mar: oceanografía geológica y oceanografía química. 3th ed. Mexico DF: Fondo de Cultura Económica; 2002.
- Código Alimentario Argentino. Cap. XII, Art 982. Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007. Modificado por Resolución Conjunta SPReI N° 34/2012 y SAGyP N° 50/2012.
- Connelly S, Wolyniak E, Dieter K, Williamson C, Jellison K. Impact of zooplankton grazing on the excystation, viability, and infectivity of the protozoan pathogens *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. Applied and Environ Microbiol. 2007; 73(22): 7277-7282.
- Costamagna SR, Visciarelli E, Lucchi L, Basualdo JA. Parásitos en aguas del arroyo Naposta, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Parasitol Latinoam. 2005; 60: 122-126.
- Delpont TC, Asher AJ, Beaumont LJ, Webster KN, Harcourt RG, Power ML. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2014; 3(3): 269-275.
- DeRegnier D; Cole L, Schupp D, Erlandsen S. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. Appl Environ Microbiol. 1989; 55(5): 1223-1229.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(1): 110-140.
- García LS. Practical guide to diagnostic parasitology. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2009.
- Johnson D, Enriquez C, Pepper I, Davis T, Gerba C, Roset J. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. Wat Sci Tech. 1997; 35(11-12): 261-268.
- Kato S, Jenkins M, Fogarty E, Bowman D. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in field soil and its relation to soil characteristics: analyses using the geographic information systems. Sci Total Environ. 2004; 321: 47-58.
- Liang K, Zeger S. Longitudinal data analysis using generalized linear models. Biometrika, 1986; 73: 13-22.
- Lindsey JK. Models for repeated measures. 2nd ed. New York: Oxford Univ. Press; 2001.
- Lujan H. *Giardia* and giardiasis. Medicina (B Aires). 2006; 66: 70-4.
- Lura MC, Beltramino D, Abramovich B, Carrera E, Haye MA, Contini L. El agua subterránea como agente transmisor

de protozoos intestinales. Arch Argent Pediatr. 2000; 98(1): 18-26.

Modini L, Cameroni P, Zerbatto M, Eliggi S, Lerman B. Monitoreo de contaminación bacteriológica en aguas recreacionales de la Laguna Setúbal. XXII Congreso Nacional del Agua, 2009, Trabajo 33, p. 49, Trelew, Argentina.

Molina N, Minvielle M, Grenóvero S, Salomón C, Basualdo J. High prevalences of infection with *Giardia intestinalis* genotype B among children in urban and rural areas of Argentina. Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105: 299-309.

Pedley S, Yates M, Schijven JF, West J, Howard G, Barrett M. Pathogens: Health relevance, transport and attenuation. In: Schmoll O, Howard G, Chilton J, Chorus I, editors. Protecting groundwater for health. Managing the quality of drinking-water sources, 1st ed. London: IWA publishing and World Health Organization; 2006. p. 49-80.

Pitkänen T, Juselius T, Isomäki E, Ilkka T, Miettinen IT, Valve M, Kivimäki A et al. Resources. 2015; 4: 637-654.

Poma HR, Gutierrez Cacciabue D, Garce B, Gonzo EE, Rajal VB. Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. Sci Total Environ. 2012; 433: 98-109.

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012.

Robertson LJ, Gjerde BK. Fate of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the Norwegian aquatic environment over winter. Microb Ecol. 2006; 52: 597-602.

Ryan U, Cacciò S. Zoonotic potential of *Giardia*. Int J Parasitol. 2013; 43: 943-956.

Savioli L; Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. Trends Parasitol. 2006; 5(22): 203-208.

Servicio de Hidrografía Naval [Internet]. Centro argentino de datos oceanográficos. Datos de temperatura (Estaciones Fijas) [consultado: 1 ago 2014; citado 1 abr 2016]. Disponible en: <http://www.hidro.gob.ar/ceado/Ef/Inventar.asp>

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000; 30: 1379-93.

Thompson RCA. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. Ann Nestlé Esp. 2008; 66: 23-9.

World Health Organization. Protecting surface water for health. Identifying, assessing and managing drinking-water quality risks in surface-water catchments. 1st ed. Ginebra: World Health Organization; 2016.

Zerbatto M, Lerman B. Coagulación optimizada en el tratamiento de potabilización de agua. Efecto sobre la remoción de quistes de *Giardia intestinalis* y oquistes de *Cryptosporidium* spp., 1st ed. Berlin: Editorial Académica Española; 2016.

Human toxocariosis: *in vitro* production of soluble mediators against *Toxocara canis* infection

MARINI V. ^{1,2}, LAIOLO J. ¹, LOZANO N. ³, VARENGO H. ¹

¹ Cátedra de Parasitología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba.

² Laboratorio Central Clínica Universitaria Reina Fabiola. Fundación para el Progreso de la Universidad Católica de Córdoba

³ Servicio de Alergia e Inmunología. Clínica Universitaria Reina Fabiola. Fundación para el Progreso de la Universidad Católica de Córdoba.

Corresponding Author:

Vanina Marini: vmarini@hotmail.com

Summary

Toxocara canis (*T. canis*) is an intestinal nematode that affects dogs. In humans, this geohelminth induces visceral larva migrans (VLM) syndrome, which is associated with eosinophilia, increased serum IgE and inflammation of the airways. In general, chronic nematode infections induce a polarized TH2 immune response. There are observations that the macrophages response to gastrointestinal nematodes in which the alternative activation pathway plays a more important role in resistance. However, whether or not *Toxocara* infections induce alternative activation of human monocytes/macrophages is still a matter of debate. The objective of this study was to determine the pattern of IL12 and IL10 levels and nitric oxide (NO) production *in vitro* of human adherent cells against antigens from *T. canis*. For this purpose the *in vitro* cytokine production of adherent cells from healthy subjects was examined in response to stimulation with antigens from larval stage of *T. canis*. Cell culture supernatants were removed from antigen stimulated and unstimulated cultures after 24 hours, 15 and 20 days post infection and the concentration of IL-12, IL-10 and NO concentrations were determined. The results revealed high levels of IL-12 at 24 hours post stimulation. After that time, the concentration of this cytokine declined to undetectable levels. IL-10 revealed a progressive increase from the 24 hours until the 20th day post stimulation. Conversely not detectable levels of NO were found during the study. Therefore, we concluded that during early *T. canis* infection, the activation and suppression of immune processes occur simultaneously and cytokines of adherent cells contribute to the regulation of the immune response.

Introducción

Toxocariosis, caused by infection with larvae of *Toxocara canis* (*T. canis*), and to a lesser extent by *Toxocara cati* (*T. cati*) and other ascaridoid species is one of the most widespread public health and economically important zoonotic parasitic infections humans. This neglected disease has been shown through seroprevalence studies to be especially prevalent among children from socio-economically disadvantaged populations both in the tropics and sub-tropics and in industrialised nations (Alcantara-Neves et al. 2014). Human infection occurs by the accidental ingestion of embryonated eggs or larvae from a range of wild and domestic paratenic hosts (Macpherson 2013). The infection is manifested in humans with a range of clinical syndromes including covert or common toxocariosis, visceral and ocular larva migrans and neurotoxocariosis (Despommier 2003). In general, chronic nematode infections induce a polarized Th2 immune response. However, during its initial phase of infection, a strong pro-inflammatory response is part of the immunological profile and might determine the outcome and/or pathology of the infection (Resende et al. 2015).

Previous works have shown that toxocariosis may increase predisposition to the development of allergic diseases, especially in children (Woodhall et al. 2014, Nagy et al. 2012). Several studies have revealed that the expression of cytokines is regulated by different mechanisms. Kuroda and col. (2001) observed that *Toxocara*-derived antigens can stimulate macrophages to produce IL-6, which enhances the differentiation of Th2 cells. This polarization is associated with the production of IL-5, IL-10 and IL-13 and the secretion of IgE (Turner et al. 2003). Macrophages play a critical role in destroying intracellular pathogens. In this sense, when they are activated by the T helper (Th) 1 cytokines, interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) produce proinflammatory mediators, such as nitric oxide and IL-12 (Babu et al. 2009); however, macrophages can also be activated by Th2-type cytokines (particularly IL-4 and IL-13) that cause the development of a phenotype, termed "alternative activation," that is distinct from

the classical phenotype (Gordon 2003, Anthony et al. 2006). However, whether or not *Toxocara* infections induce alternative activation of human monocytes/macrophages is still a matter of debate. In fact, the systemic immune response to *T. canis*

infection has been only moderately examined in humans (Malla et al. 2006, Bourke et al. 2010). Therefore, the purpose of this study was to determine the pattern of IL12 and IL10 levels and nitric oxide production *in vitro* of human adherent cells against E/S Ag *Toxocara canis* stimulation.

Material and methods

Blood samples were obtained in sterile conditions (5ml, i.v.) from healthy children who assisted at the Pediatric Allergy and Immunology Department of Reina Fabiola Clinic. All subjects were seronegative for *T. canis* and for parasitological tests in stool samples. All the participants read, understood and signed an informed consent. Ethical approval was granted by the Ethical Committee of Clínica Universitaria Reina Fabiola. Fundación para el Progreso de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood using a density gradient centrifugation technique and following the protocol provided by Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Inc., Saint. Louis, Missouri, USA) with slight modifications. Undiluted blood was layered 1:1 over Hystopaque. After centrifugation (400x g for 30 min at room temperature), the cells from the interface were aspirated and washed twice with sterile RPMI 1640 medium. The resulting cell pellet was resuspended in a small volume of PBS and the viable cell concentration was determined by microscopic examination using the trypan blue exclusion technique. Viability was >90% in all samples. The cells were suspended in RPMI medium supplemented with 2 mM of glutamine, 100 mg/ml of streptomycin, 100 IU of penicillin and 10% of heat inactivated fetal bovine serum (FBS). Monocyte-macrophage were separated from non adherent cells by incubation for two hours in 5% CO₂ and 37 °C. Subsequently, non adherent cells were removed and macrophages were washed and culture with FBS 10% (Natocor, Argentine) and supplemented RPMI (Gibco, Auckland, NZ). Morphology was observed using Giemsa staining procedure. This cells (about 1x10⁶/ml) were cultured within 6 hours of collection and were maintained in a humidified environment of 5% CO₂ at 37°C. Adherent cells were stimulated with 10 ug/mL of E/S Ag of *T. canis* for 48 hours at

37° C and 5% CO₂. The culture supernatants were aspirated for detection of nitric oxide and cytokines in the presence or absence of *T. canis* antigen and frozen at -20 °C until further use. *T. canis* adults were obtained from the small intestines of puppies by spontaneous elimination. The eggs were isolated from uteri by gentle mechanical maceration, and then purified by straining and cultured to embryonation in 50 mL culture flasks. Isolations were kept in a controlled temperature chamber at 26 ± 1 °C, for 60 days until larvae developed. Embryonation was evaluated microscopically once per week and embryonated eggs were induced to hatch following the physiological method described elsewhere (Ponce-Macotela et al. 2011). Larvae were purified and maintained in RPMI-1640 medium, to collect excretion secretion antigens (E/S) in a tube containing protease inhibitors cocktail. Subsequently they were concentrated by dialysis (10 KDa cut off), and quantified using the Bradford method, aliquoted and stored at -70°C until further use.

Production of nitric oxide (NO) was measured indirectly at different times post estimation by assaying nitrites in the supernatant of macrophage culture using the Griess reaction technique. Supernatants were collected and mixed with equal volume (100 ul) of Griess reactive (Sigma-Aldrich Inc., Saint. Louis, Missouri, USA). Optical density (540 nm) measurements were converted to micromoles of nitrites (uM) using a standard curve of sodium nitrite. For determination of IL-12 and IL-10 levels commercial sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used (Thermo Scientific, Pierce Technology, USA). The detection limits in pg/mL for IL-12 and IL-10 were 3 pg/ml. The cytokine concentrations (pg/ mL) for each sample were calculated by interpolation from a standard curve. Software GraphPad Prism software, version 6 was used for the statistical analysis. Statistical significance between mean cytokine responses (p < 0.05) was analyzed using Mann-Whitney's test.

Results and Discussion

At 24 hours post stimulation a peak production of IL-12 occurred (Table 1).

Time post infection	n	ELISA (pg/ml)	
		IL-12	IL-10
basal	10	3,8 ± 1,3	3,4 ± 0,8
24 hours p.i	10	11,8 ± 3,3	3,6 ± 1,3*
15 days p.i	10	0,5 ± 0,01	5,5 ± 3,1
20 days p.i	10	0,5 ± 0,02	15,6 ± 4,4*

p.i: post infection

* $p \leq 0,04$

Tabla 1. Levels of Cytokines in culture supernatans of adherent cells.

After that time, the concentration dropped to low levels. The results related to IL-10 revealed a progressive increase in this cytokine from the 24 hours until the 20th day post stimulation. Conversely not detectable levels of nitric oxide were found during the study. Similar results were obtained when adherent cells were cultured with larval stage (L2/L3) of *T. canis* (IL 12 at 24 hours post stimulation: 15 ± 5 pg/ml). The IL 10 levels (pg/ml) were: 24 hs: 6 ± 3 ; 15 days: 7 ± 2 ; 20 days: 17 ± 4 ($p = 0,04$).

Cells activation and Th-subset polarization following infection with parasites reflects the influence of the initial local cytokine environment. The study of these soluble immune modulators reveals the important role that they play in mounting effective as well as detrimental immune responses to pathogens. Examining the cytokine responses of macrophages and lymphocytes in culture can provide important understanding of how immune responses to pathogens are orchestrated. The assessment of cytokine levels in various parasitic infections has shown that infectious agents may trigger the production of pro-inflammatory cytokines and, in this way, modulate the course of a disease (De Avila et al. 2016).

In the present work we observed a pro-inflammatory response mediated by IL-12 production in the early phase of the stimulation related to a first encounter between the host cells and the parasite. Studies conducted on *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis* suggest that in the early phase of infection, the Th1 response, rather than the Th2 response, is induced, and there is a polarization of the response from Th1 to Th2 (Malla et al. 2006). In accordance with these authors our data showed a significant increase of IL-10 levels at the end of the study suggesting a modulation of the immune system triggered by *T. canis* antigens. Therefore, in this way we can explain the viability of larval stage at 20th day post interaction with adherent cells observed in other cultures conducted with the same experimental conditions. On the other hand, it can explain the elevated levels of IL-10 previously observed in serum from chronic infected patients compared with IL-10 concentrations in serum from healthy patients suggesting a systemic immunomodulation during the parasite infection (data not shown).

With respect to NO, macrophages recognize antigen microorganisms through their different

receptors and trigger the production of inflammatory mediators inducing the activity of the inducible nitric oxide synthase enzyme (NOSi2). Important amounts of NO are synthesized, causing modifications in the cellular microenvironment (Gutierrez et al. 2009). However, an excess of NO has harmful effects on the host's tissues (Silva 2010). In our work, the absence of NO could be associated to a modulation triggered by the parasite in order to evade the host immune response. On the other hand, NO production probably does not have a predominant role in eliminating this parasite because *T. canis* is an extracellular microorganism.

In accordance with Valli and col. (2010) we consider that while the *in vitro* study of PBMC cytokine responses cannot be directly extrapolated to antigens *in vivo* responses, the results do highlight the dynamic and fluctuating nature of cytokine production. Therefore, immune responses in helminth infections, depends on the extent of the parasite load, the timing and duration of the infection and the status of the host immune system.

It is important to highlight that this study was performed with human adherent cells and these findings, taken together, encourage the continuation of studies tending to reveal other cellular and molecular components of the innate immune response involved in the pathogenic mechanisms triggered during *T. canis* infection in paratenic hosts.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Marina Ponzio for reading the article and correcting the translation of the manuscript, Dr. Alejandro Lozano and Ricardo Saranz for their permanent advice.

Financial support was obtained from the Secretary of Research of Córdoba Catholic University, Argentina.

Referencias

Alcântara-Neves NM, de Britto G, Veiga RV, Figueiredo CA, Fiaccone RL, da Conceição JA, et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Res Notes* 2014; 7: 817. doi:10.1186/1756-0500-7-817.

Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, et al. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med.* 2006; 12: 955–960.

Babu S, Kumaraswami V, Nutman T. Alternatively Activated and Immunoregulatory Monocytes in Human Filarial Infections. *Infect. Dis.* 2009; 199: 1827–1837. doi:10.1086/599090.

Bourke CD, Maizels RM, Mutapi F. Immune heterogeneity and its sources in human helminth infection. *Parasitol.* 2010; 138: 139–159

De Avila LF, De Leon PM, De Moura DQ, Berne ME, Scaini CJ, Leivas Leite FP. Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunol.* 2016; 38: 326–330.

Desponmier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16: 265–272.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 23–35.

Gutierrez F, Mineo T, Pavanelli W, Guedes P, Silva J. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009; 104: 236–245.

Kuroda E, Yoshid Y, Shan BE, Yamashita U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor- α production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol.* 2001; 23: 305–311.

Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Int J of Parasitol.* 2013; 43: 999–1008.

Malla N, Fomda BA, Thoakar MA. Serum cytokine levels in human ascariasis and toxocariasis. *Parasitol. Res.* 2006; 98: 345–348.

Nagy D, Bede O, Danka J, Szénási Z, Sipka S. Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough

associated with *Toxocara canis* infection. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 581–588. Ponce-Macotela M, Rodríguez-Caballero A, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. A simplified method for hatching and isolating *Toxocara canis* larvae to facilitate excretory-secretory antigen collection in vitro. *Vet. Parasitol.* 2011; 175: 382–385.

Resende NM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães AC. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite and Vectors* 2015; 8: 354. doi: 10.1186/s13071-015-0962-7

Silva M. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87: 805–813.

Turner JD, Faulkner H, Kamgno J, Cormont F, Van Snick J, Else KJ et al. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. *J. Infect. Dis.* 2003; 188: 1768-1775.

Valli JL, Williamson A, Sharif S, Rice J, Shewen PE. In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 2010; 134: 218–229

Woodhall DM, Mark L, Eberhard ML, Parisi ME. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90: 810-813.

***Mepraia spinolai* (Porter) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): morfología e índice de infección en su área de distribución.**

GONZÁLEZ CR. ^{1,2}, REYES C. ², VALDERRAMA L. ²

¹ Instituto de Entomología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

² Laboratorio de Entomología Médica, Sección Parasitología, Instituto de Salud Pública de Chile.

Correspondencia:
Christian González
Instituto de Entomología, Facultad de Ciencias Básicas, UMCE
e-mail: christian.gonzalez@umce.cl

Summary

The main morphological and taxonomic characteristics of *Mepraia spinolai* are described. This is the main wild vector of Chagas' disease in Chile. It is endemic to Chile, distributed between the 26 ° S (Atacama Region) and the 34 ° S (O'Higgins Region), from the coastal zones to the 3000 msnm. It is a predominantly diurnal insect, strict hematophagus, that inhabits arid and semi-arid zones occupying rocky habitats where stone glides, bird nests, burrows, bromeliads (*Puya sp.*) and pircas. Their populations are associated to native micromamíferos such as the Darwin's earwig (*Phyllotis darwini*), the degú (*Octodon degus*), the olivaceous mouse (*Abrothrix olivaceus*), the long-tailed mouse (*Olygorizomys longicaudatus*), the common chinchilla mouse (*Abrocoma benetti*) and yaca (*Thylamys elegans*), but have also been detected in chicken coops and goat pens. The overall *T. cruzi* infection rate is currently estimated at 26.56%.

Introducción

Los Triatominae son una particular subfamilia de hemípteros de la familia Reduviidae que reúne 147 especies conocidas, todas ellas hematófagas que se alimentan exclusivamente de sangre de vertebrados, siendo, por consiguiente, todas ellas potenciales vectores del protozoo *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la Enfermedad de Chagas, aunque la gran mayoría de ellas tiene escaso impacto epidemiológico como vectores del patógeno.

Las 147 especies de Triatominae se agrupan en más de 16 géneros y 6 tribus, todos ellos primariamente de distribución americana, aunque unas pocas especies de la tribu Triatomini alcanzan, en su distribución, regiones de India y Australia. Las tribus más diversificadas a nivel específico corresponden a Triatomini y Rhodniini agrupando más de 130 especies conocidas en su conjunto (Schofield & Galvao, 2009); estas tribus, han evolucionado en Sudamérica, estrechamente asociados a los cambios geológicos y climáticos que ha experimentado el continente debido al levantamiento de la Cordillera de Los Andes (Justi et al., 2016).

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una infección sistémica causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Esta patología es una zoonosis en la que participan un gran número de reservorios vertebrados y transmisores

triatominos que se produce por el contacto entre las heces del vector, con el patógeno, y la sangre y las mucosas de los vertebrados, constituyendo un grave problema sanitario en América Latina.

Para Chile se citan cuatro especies de vinchucas: *Triatoma infestans* (Klug), de amplia distribución en el cono sur de América del Sur y principal vector de la Enfermedad de Chagas en Chile, *Mepraia spinolai* (Porter), *M. gajardoi* Frías, Henry & González y *M. parapatrica* Frías. Las tres últimas son endémicas del país y, al menos las dos primeras, también comprobadamente infectadas con *T. cruzi*. *M. spinolai* registra altos índices de infección, particularmente en zonas de la IV Región, lo cual constituye un riesgo para las poblaciones humanas que han ocupado las áreas de distribución de este vector.

En este trabajo se comentan aspectos de la morfología de las ninfas y adultos de *M. spinolai* así como sus índices de infección registrados luego de analizar, por medio de la técnica de PCR, extensas series de material provenientes del área de distribución de esta especie.

1. Clasificación taxonómica

Reino: Animalia
 Filo: Arthropoda
 Superclase: Hexapoda
 Clase: Insecta

Orden: Hemiptera
 Suborden: Heteroptera
 Infraorden: Cimicomorpha
 Superfamilia: Reduivoidea
 Familia: Reduviidae
 Subfamilia: Triatominae
 Tribu: Triatomini
 Género: *Mepraia* Mazza, Gajardo & Jorg, 1940
 Especie: *Mepraia spinolai* (Porter, 1934)

Mepraia spinolai fue descrita por el destacado naturalista Carlos E. Porter (1934), como *Triatoma spinolai*, a partir de ejemplares capturados en las cercanías de Vicuña (Región de Coquimbo). Unos años después Usinger (1939), describió a *Triatoma chilena*. Posteriormente, Mazza, Gajardo & Jorg (1940) crearon el género *Mepraia* en base a *T. spinolai* al observar el polimorfismo alar en esta especie. Casi al mismo tiempo, Neiva & Lent (1940) en base a hembras y machos ápteros de *T. spinolai*, describieron un nuevo género y especie denominándolos *Triatomaptera porteri*. Lent & Wygodzinsky (1979) sinonimizan *Mepraia spinolai*, *Triatoma chilena* y *Triatomaptera porteri*. Finalmente, Lent et al. (1994) revalidaron el género *Mepraia* en base al marcado polimorfismo alar, el tipo de conexivo observado en la hembra, además de diferencias presentes en la genitalia del macho que se observan respecto de *Triatoma*.

2. Características morfológicas

Los Hemiptera son un dominante grupo de insectos exopterigotos que agrupan más de 85.000 especies en el planeta. En Chile el orden se encuentra representado por cerca de 1.000 especies. Una de las características más distintivas del grupo, además de la conformación de sus alas, son las piezas bucales en donde, las mandíbulas y las maxilas, se modifican en forma de estiletes conteniendo el canal alimentario y salival. En Chile la familia Reduviidae, a la cual pertenece *M. spinolai*, agrupa unas 20 especies en 13 géneros. Incluye especies predatoras que cuentan con adaptaciones morfológicas para la captura de presas; la subfamilia Triatominae puede ser identificada por presentar el labio dividido en tres segmentos alcanzando ventralmente hasta el pronoto, ocelos ampliamente separados y ubicados, por lo general, en los costados de la cabeza; además de la ausencia de sulcus transversal detrás de los ojos.

M. spinolai, en su estado adulto, mide entre 18 a 22 mm, de coloración general negruzca a café-negruzca con tonalidades anaranjadas o rojizas en el conexivo abdominal y en parte de los escleritos adyacentes (Fig. 1).



Figura 1. Ejemplar adulto macho de *Mepraia spinolai*

En esta especie se presenta un marcado polimorfismo, en donde las hembras son siempre micrópteras mientras que los machos son micrópteros, macrópteros o braquípteros, una característica que se encuentra asociada a los genes dispuestos en el cromosoma Y y su expresión particularmente en las poblaciones que ocupan zonas más áridas (Frías & Atría 1998). Las ninfas, por el contrario, miden desde 4,8 mm, en el 1° estadio, hasta 15 mm en el 5°, son preferentemente grisáceas o del color del sustrato en el cual ellas se encuentran. Desde el 1° al 3° estadio no presentan esbozos alares, los cuales se manifiestan a partir del 4° estadio.

Los principales caracteres morfológicos que diferencian a *Mepraia spinolai*, son los siguientes:

Huevos. Miden entre 3 mm de largo y 1,5 mm de ancho, de coloración blanco pasando a rosado. Opérculo de 0,85 mm.

Ninfas. Ojos de menor diámetro que en adultos respecto del ancho de la cabeza. Tubérculo antenífero en línea con la mitad inferior del ojo. Abdomen café-rojizo claro en la parte dorsal central, característico de la ninfa de primer estadio, el que es más oscuro en las de segundo; en ninfas de tercer estadio aparecen manchas negras laterales abdominales, las que desaparecen en el cuarto estadio donde además aparecen los esbozos alares. Las ninfas de quinto estado presentan abdomen plumoso, pasando a negruzco en la parte terminal (Frías et al. 1987)

Adultos. Cabeza: completamente negruzca, alargada, mucho más larga que el pronoto, rugosa y con presencia de granulaciones dorsales. Ojos sobresalientes, en vista dorsal, y dispuestos en la parte baja de la cabeza, en vista lateral. Clípeo con cerdas en la parte anterior, ensanchando su diámetro hacia posterior; genas redondeadas. Ocelos con bordes rojizos. Antenas negruzcas; primer segmento antenal sobrepasando ligeramente el ápice del clípeo; segundo segmento con abundantes cerdas. Rostro alargado, cerdoso, dispuesto en posición ventral y sobrepasando la posición de los ojos. Cuello negruzco, más claro que el color de la cabeza, con débiles manchas amarillentas laterales.

Tórax: pronoto negruzco brillante, algo más claro que el resto del cuerpo, porción anterior granulosa,

sin tubérculos discales ni laterales; zona posterior rugosa. Escutelo completamente negruzco brillante y rugoso, con proceso distal pequeño en ejemplares macrópteros y braquípteros o ausente en micrópteros. Hemiélitros café-negruzcos en toda su extensión. Patas largas y delgadas, uniformemente negruzcas; fémur y especialmente tibia y tarso cubierto con pilosidad de diferente tamaño.

Abdomen: dorsalmente convexo, ligeramente comprimido en la línea media, café-negruzco, con delicadas setas mayoritariamente distribuidas en los segmentos posteriores; espiráculos respiratorios no adyacentes a la sutura conexival. Conexivo rojo-anaranjado extendido a lo largo de toda la sutura intersegmental o principalmente dorsal.

3. Antecedentes biológicos

M. spinolai es un insecto hemimetábolo, con cinco estadios ninfales previos a la emergencia del adulto. Hematófago estricto en todos sus estadios. *M. spinolai* habita en zonas áridas y semiáridas ocupando hábitat rocosos en donde se observan deslizamientos de piedras, nidos de aves, madrigueras, bromeliáceas (*Puya sp.*) y pircas (Canals et al. 1998, Botto-Mahan et al. 2015). Generalmente, las poblaciones se encuentran asociadas a micromamíferos nativos tales como: el ratón orejudo de Darwin (*Phyllotis darwini*), el degú (*Octodon degus*), el ratón oliváceo (*Abrothrix olivaceus*), el ratón de cola larga (*Olygorizomys longicaudatus*), el ratón chinchilla común (*Abrocoma benetti*) y la yaca (*Thylamys elegans*), pero también se han detectado en gallineros y corrales de cabras (Botto-Mahan et al. 2005^a, Campos et al. 2007).

Presenta hábitos preferentemente diurnos y su ciclo biológico está relacionado con la humedad, temperatura, cantidad de sangre ingerida y fuente de alimentación, parámetros que influyen directamente en su desarrollo, rendimiento reproductivo y por tanto en su dinámica poblacional (Canals et al. 1998, Alzamora et al. 2007)

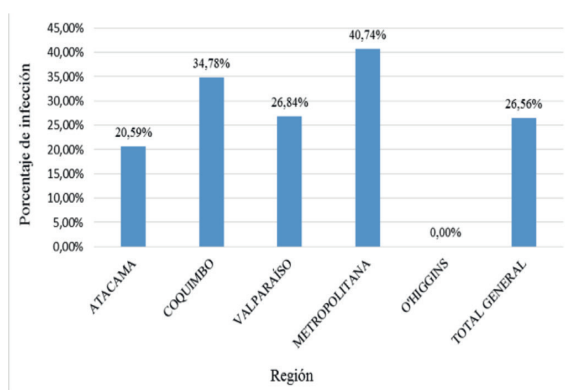
4. Distribución

Esta especie, endémica de Chile, se distribuye entre los 26°S (Región de Atacama) y los 34°S (Región de O'Higgins), desde las zonas costeras hasta los 3000 msnm (Canals et al. 1998, Botto-Mahan et al. 2015).

5. Importancia médica

Mepraia spinolai es una especie silvestre. No obstante, debido a la urbanización de sectores silvestres, a las actividades laborales y recreacionales desarrolladas en su hábitat natural y a los buenos resultados obtenidos en el control de *T. infestans*, puede cobrar importancia epidemiológica como vector de la Enfermedad de Chagas, en la medida que su densidad poblacional aumente y que el hombre empiece a formar parte de su dieta habitual (Canals et al. 1999, Canals et al. 2000). Así mismo, cabe considerar que *M. spinolai* posee una amplitud de nicho superior a *T. infestans*, pudiendo adaptarse a hábitats peridomiciliarios alimentándose no sólo de los animales que habitan en él, sino que también del hombre (Canals et al. 2000, Canals et al. 2001).

De acuerdo a los resultados obtenidos por el laboratorio de referencia nacional, Laboratorio de Entomología Médica del Instituto de Salud Pública, durante el período 2005-2016, se recibieron 1.994 ejemplares de *M. spinolai*, tanto ninfas como imagos, para la búsqueda de *T. cruzi* mediante la técnica de PCR, provenientes desde la región de Atacama hasta la región del Libertador General Bernardo O'Higgins. De las 1.994 muestras recibidas, se analizaron 1.977, obteniendo un porcentaje de infección general por *T. cruzi* de 26,56%. Sin embargo, las regiones Metropolitana y de Coquimbo arrojaron porcentajes de infección superiores, con un 40,74% y un 34,78% respectivamente (Gráfico 1).



Fuente: Laboratorio de Entomología Médica, ISP.

Gráfico 1. Distribución de los porcentajes de infección por *T. cruzi* en *M. spinolai* según región durante el período 2005-2016.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Botto-Mahan et al. (2005b), que obtuvo una tasa de infección de 38,3-54,1% en los distintos estadios ninfales de *M. spinolai* provenientes de la Reserva Nacional Las Chinchillas, en la región de Coquimbo.

Debido a que este triatomino silvestre es menos eficiente en la transmisión del protozoo que *T. infestans*, puesto que posee un tiempo de picada inferior y una defecación retardada, y a que el hombre no forma parte de su dieta habitual, *M. spinolai* no se considera un vector importante de *T. cruzi* para el hombre (Canals et al. 1998, Canals et al. 2001). Sin embargo, los triatominos silvestres cumplen un rol fundamental en la mantención del ciclo silvestre de *T. cruzi* en Chile (Ministerio de Salud de Chile, 2016). Por lo tanto, tomando en cuenta que los porcentajes de infección por *T. cruzi* en *M. spinolai* son elevados y que el hombre se ha introducido en el hábitat natural de esta especie, el contacto de *M. spinolai* con el hombre supone un riesgo de transmisión de la Enfermedad de Chagas.

Referencias

- Alzamora A, Correa P, Gaggero E, Acuña-Retamar, M, Cattán, P. Conducta de picada y defecación de *Mepraia spinolai* en dos hospederos frecuentes en su hábitat. Parasitol. Latinoam. 2007; 62: 112 -117.
- Botto-Mahan C, Cattán PE, Canals M, Acuña M. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia spinolai* in wild environment. Acta Tropica 2005a; 95(2): 160-163.
- Botto-Mahan C, Ortiz S, Rozas M, Cattán PE, Solari A. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005b; 100(3): 237-239.
- Botto-Mahan C, Correa JP, Bacigalupo A, Campos-Soto R, Cattán PE, Solari A. Ecología de los triatominos endémicos de Chile. Parasitol. Latinoam. 2015; 64(3): 12-19.
- Campos R, Botto-Mahan C, Ortiz S, Acuña M, Cattán PE, Solari A. *Trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007; 76(2): 324-326.
- Canals M, Ehrenfeld M, Solís R, Cruzat L, Pinochet A, Tapia C, Cattán PE. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en

- condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol. día.* 1998; 22(3-4):72-78.
- Canals M, Bustamante RO, Ehrenfeld M, Cattán PE. Assessing the impact of disease vectors on animal populations. *Acta Biotheoretica.* 1999; 46: 337-345.
- Canals M, Ehrenfeld M, Cattán PE. Situación de *Mepraia spinolai*, vector silvestre de la Enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. *Rev. Med. Chile.* 2000; 128(10): 1108-1112.
- Canals M, Cruzat L, Molina MC, Ferreira A, Cattán PE. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae), wild vector of chagas disease in Chile. *J. Med. Entomol.* 2001; 38(2): 303-307.
- Frías D, Martínez H, Wallace A. Algunos aspectos taxonómicos de *Triatoma spinolai* Porter (Hemiptera: Triatominae). *Acta Entomol. Chilena* 1987; 14: 155-170.
- Frías D, Atria J. Chromosomal variation, macroevolution and possible parapatric speciation in *Mepraia spinolai* (Porter) (Hemiptera: Reduviidae). *Genet. Mol. Biol.* 1998; 21(2): 179-184.
- Justi SA, Galvão C, Schrago CG. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(4): e0004527. doi:10.1371/journal.pntd.0004527
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Disease. *Bull Am Museum Nat Hist.* 1979; 163: 123-520.
- Lent H, Jurberg, J, Galvao C. Revalidação do género *Mepraia* Mazza, Gajardo & Jorg, 1940 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1994; 89: 347-352.
- Mazza S, Gajardo-Tobar R & Jörg ME 1940. *Mepraia* novum genus de Triatomidae, *Mepraia spinolai* (Porter, 1933), nov. comb. redescrición del macho y descripción de la hembra. *Misión de Estudios de Patología Regional Argentina, Publicación* 44:3-30, figs. 1-27.
- Ministerio de Salud de Chile 2016. Departamento de Enfermedades Transmisibles. Informe Programa Nacional Integral de Enfermedad de Chagas. Julio 2016. Disponible: <http://diprece.minsal.cl/programas-de-salud/programas-enfermedades-transmisibles/chagas-2/informacion-para-equipos-de-salud-chagas/>
- Neiva A, Lent, H. Sobre un nuevo Triatomideo chileno: *Triatomaptera porteri*. Nota previa. *Brasil-Medico* 1940; 54: 265-267.
- Porter CE. Una *Triatoma* nueva chilena. *Rev. Chilena Hist. Nat.* 1934; 37: 192-193.
- Schofield CJ, Galvao C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 2009; 110: 88-110.
- Usinger RL. Descriptions of new Triatominae with a key to genera (Hemiptera, Reduviidae). *University of California Publications in Entomology* 1939; 7:33-56.

Artículo especial

From epidemic outbreaks to pandemics: the critical time of percolation

CANALS M.^{1,2}, TORRES R.^{2,3}, CANALS A.^{3,4}, FUENTES M.³, ALVARADO S.^{2,5}, CACERES D.²

¹ Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Programa de Salud Ambiental, Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

³ Programa de Bioestadística, Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

⁴ Dirección Académica, Clínica Santa María.

⁵ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

Correspondencia:

Mauricio Canals L. Programa de Salud Ambiental,

Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina,

Universidad de Chile.

Independencia 939. Postal Code: 8380453. E-mail: mcanals@uchile.cl

Summary

One transcendental aspect of epidemiology is to predict the evolution of infectious diseases, especially in cases of pandemic outbreaks. In the last decade the emphasis has been placed in the spatial progression of epidemics. Percolation models have been proposed that describe the progress of parasitic infestations and epidemics. In this study, we propose a model that connects the temporal and spatial progress of a global epidemic, determining the time at which an epidemic outbreak becomes a pandemic based on the percolation threshold.

First, we propose a simple model of the temporal progression of the geographic progress of epidemics. By means of simulation, we estimate the percolation threshold of epidemics at two scales: global and local. Then, we connect both approaches, determining the time at which this threshold is reached (the critical time of percolation).

The advanced model yields a logistic progress of infected localities over time. The estimated percolation thresholds were approximately 59% of the infected localities at local and global scales, and these were not different from the theoretical percolation threshold of square grids.

We propose an easy method for following and predicting the geographical progression of infectious disease over time at several scales. Another remarkable aspect of the advanced model is that it allows us to define a pandemic in a more precise form, such as the state of and epidemics in which the percolation threshold is reached, changing the current definition of epidemics in phase 6 (the pandemic phase).

Keywords: epidemics, model, percolation

Introducción

A number of viruses have pandemic potential. For example, the coronavirus, which is responsible for the severe acute respiratory syndrome (SARS), caused more than 8000 cases in 2003 (Fineberg 2014). The outbreak of EBOLA threatened to spread to the entire world in 2014 and now counts more than 12,000 cases (CDC 2015). More classic examples are the Influenza viruses, which are characterized by their persistence, versatility, potential severity, and speed of spread. These viruses are endemic in a number of species, including humans, birds, and pigs. The influenza virus causes annual outbreaks that are punctuated by occasional worldwide pandemics, which are characterized by sustained community spread in multiple regions of the world. For example, 1918–19 A(H1N1) affected 50 million of persons (all viral segments of avian origin); 1957–69 A (H2N2) affected 2–4 million persons (five segments of A(H1N1) + (PBI;HA;NA) of avian origin); 1968–70 A (H3N2) affected 1–2 million persons (six segments of H2N2 + (PBI and HA) of avian origin); 1977–79

A (H1N1) affected 0.7 million (identical with 1918–19 virus) (Ebrahim et al. 2010), and the recent 2009 A(H1N1), which combined viral parts from three viral lineages (triple reassortant, classical and Eurasian swine), had millions of cases all over the world (Garten et al. 2009, Shrestha et al. 2011).

Additionally, several cases and deaths in humans have been caused by a number of avian influenza A viruses, such as A(H5N1), A(H7N9) and A(H10N8), as recently reported in 2013. Such cases could be harbingers of a pandemic, which is difficult to assess without knowing the history of the disease in the past. The 2009 A(H1N1) pandemic presented a public health emergency of uncertain scope, duration, and effect. The experience exposed a number of deficiencies and defects at the local and global levels. These included limitations of scientific knowledge, difficulties in decision making and complexities in international cooperation. Additionally, beyond spread, the degree to which a pandemic is defined according to the severity of the disease or whether it could be simply described as often producing many illnesses and deaths remains ambiguous (Fineberg 2014).

One of the transcendental aspects of epidemiology is to predict the evolution of infectious diseases, especially in cases of pandemic outbreaks. This attempt is usually conducted using mathematical models that consider the progress of cases over time at a certain location and relevant parameters such as the reproductive number, doubling time, and transmissibility (Bailey 1975, Anderson & May 1979, May & Anderson 1979, Canals et al. 1989a,b, Canals 1992, Heesterbeek et al. 2015, Canals 2010, Heffernan et al. 2005). However, these models do not include the spatial dimension of the disease progression or the conditions of connectivity that have been established between distant regions, factors which are currently very relevant in ecology, epidemiology and other areas such as physics (Grassberger 1983, 1991, Miller 2009, Hanski 1998). In recent decades it has placed special emphasis on the role of population mobility and networks connection by transport airlines in the spread of epidemics (Colizza et al. 2006, 2007a, 2007b, Vespignani 2009, Balcam et al. 2009, 2011, 2012, Ajelli et al. 2010, Goncalves et al. 2013, Gomez et al. 2014, Merler et al. 2015, Schum et al. 2015). These models have been explored agent based stochastic spatially explicit discrete-time simulation models and stochastic metapopulation models (GLEaM) simulating the global spread of epidemics and determining the threshold below the disease vanish.

In the field of physics, percolation models study the connectivity between cells. Hammersley and Broadbent introduced the concept in 1956 for studying the obstruction of gas filters (Grassberger 1983). The basic task was to determine the proportion of small obstructed channels that are required to attain a complete obstruction of the filter. This idea has been used to study the spatial continuity of fire spread, the spread of parasites in orchards and the spread of epidemics (Grassberger 1983, 1991, Miller 2009, Canals 2010, Canals & Canals 2010). Basically, the model studies the connectivity that occurs in a grid of square cells when each cell can be in two stages ("on" and "off"), asking for the proportion of cells in state "on" that are necessary for spatial continuity and allowing the crossing from one side to another through cells in the "on" state. In the case of infectious diseases, the "on" state represents an infected spatial area. If an infected cell can infect its neighboring cells, then a system of propagation of an infection is established. Percolation is a threshold

phenomenon independent of the path, and for the specific case of square grids, the percolation threshold $p_c = 0.5927$; i.e., over this proportion of infected cells, the infection crosses the entire grid. In the vicinity of p_c ($p - p_c \ll 1$), the critical functions $P(p) = k_1(p - p_c)^b$, $S(p) = k_2(p - p_c)^{-g}$ and $L(p) = k_3(p - p_c)^{-v}$ are universal (i.e., not dependent on the geometry of the grid), where $P(p)$ is the probability of a cell belonging to the percolating group, $S(p)$ is the average size of the percolating group, and $L(p)$ is the probability of a percolating group being formed (Grassberger 1983, 1991, Canals & Canals 2010). The percolation threshold is dependent on the shape of the grid cells.

Based on empirical studies, it has been proposed that independent of the path or configuration of infected countries the percolation threshold is also valid in the progress of an epidemic, such as A(H1N1)-2009 (Canals & Canals 2010).

In this study, we propose a simple model that describes numerically the temporal progress of an epidemic that connected with the spatial percolation threshold, determines the time at which an epidemic outbreak becomes a pandemic.

Materials and Methods

First, a simple model that relates the proportion of countries infected (p) in the world and time was proposed. Second, the percolation threshold for the grid that constitutes the countries of the world (global scale) and also the states of the U.S.A. (local scale) was estimated by means of simulation. Finally, the percolation threshold (p_c) was introduced in the first model, determining thereby the critical time for percolation (t_c).

To estimate the threshold at a global scale, a grid constituted by 147 non-insular countries was considered, which account for the entire continental surface of North, Central and South America, Europe, Asia and Oceania. Small countries whose inclusion would not have an effect on the result of this study, such as Andorra or Vatican City, were considered to be part of the neighboring countries. The cells were the countries, and their form was determined by their boundaries. At a local scale, a grid would include all of the states of the U.S.A., excluding Alaska and Hawaii. To establish a working definition of percolation at global scale an "ocean" criteria was considered; an epidemic percolates if

geographical continuity from infected countries is observed both in the north - south, as one east - west. The North-South continuity will be obtained if the infection spreads from at least a Eurasian country with coastlines on the Arctic Ocean, to at least one country that has coastlines on the Indian Ocean. The continuity East- West will be obtained if the infection spreads from at least one Asian country with coasts on the Pacific Ocean to at least a country belonging to the bloc Eurasia - Africa possessing coasts on the Atlantic Ocean and also extends through the American continent from a country bordering the Atlantic Ocean to a country bordering the Pacific Ocean.

A random variable is defined such that $X = 1$ if the locality is infected and $X = 0$ if not. A program that assigned these possible states for each locality (country or state): infected ($X = 1$; black) and not infected ($X = 0$; white) was built, and the resulting map was painted. At a global scale, the following operative definition was adopted: an epidemic percolates if it has geographic continuity of infected countries from the glacial Arctic ocean to the Indian ocean (North-South axis) and from the Pacific ocean to the Atlantic ocean, crossing by the Eurasia-Africa block and the block constituted by the American continent (East-West axis). At a local scale, the definition was the existence of geographic continuity of infected states from the Atlantic to Pacific ocean (East-West axis) and from Canada to Mexico and/or the Gulf of Mexico (North-South axis).

Defining $p = P(X = 1)$, the program generated a random number for each locality "j" of the grid, with a uniform distribution ($0 \leq n_j \leq 1$). If $n_j \leq p$, then the locality was considered to be infected ($X = 1$) and the locality was painted black. For example, if $p = 0.3$, then we obtained a map with approximately 30% of the countries (Fig. 1) or states (Fig. 2) infected. The value of p varied from 0 to 1, repeating the procedure 100 times for each value. Then, 100 maps of infected localities were obtained for each value of p . Each map was carefully examined to determine whether percolation had occurred. The percolation probability (ψ) for each value of p was calculated with $\psi = \text{number of percolation events}/100$.



Figure 1. Example of the map obtained with a proportion of infected localities $p = 0.3$ at a global scale. Countries in black and white represent infected and non-infected countries, respectively.

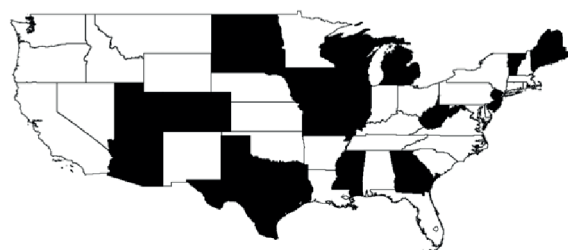


Figure 2. Example of the map obtained with a proportion of infected localities $p = 0.3$ at a local scale for EEUU. States in black and white represent infected and non-infected countries, respectively.

Graphics between p and ψ were obtained, and a probit regression was performed: $probit(\psi) = \beta_1 p + \beta_0$, where $probit(\psi) = Z\psi + 5$, and $Z\psi$ is the value Z in an cumulative normal distribution (i.e., $Z_\psi = \int_0^{\psi} \frac{e^{-z^2/2}}{\sigma} dz = \psi$).

When the model was fitted, the value of p to obtain 50% of the percolation events (p_{50}) was calculated. As in a standardized normal distribution, $probit(0.5) = 0 + 5$; then, p_{50} will satisfy the following: $5 = \beta_1 p_{50} + \beta_0$, which yields $p_{50} = (5 - \beta_0) / \beta_1$. Furthermore, because the variance of Z is 1, the standard deviation of p_{50} is $= 1 / \beta_1$ (McCullagh & Nelder 1989). In this study, we used p_{50} as a proxy for the percolation threshold (p_c).

Results

Model

Consider a proportion p ($0 \leq p \leq 1$) of infected countries (or states) at time t . The epidemic outbreak can take different time scales to progress, from weeks to decades. Thus, we use a non-dimensional differential of t : $d\tau = dt/t$.

We propose that the variation in time of p will follow a logistic model:

$$\frac{dp}{d\tau} = p(r - bp) \quad , \text{ with } r \text{ a constant}$$

that represents the intrinsic rate of increment of the proportion of infected countries, and b a parameter that represents the dense dependent effect.

Considering that when $\frac{dp}{pd\tau} = 0$, then $p = r/b = 1$.

This model can be as $\varepsilon = \frac{dp/p}{dt/t} = (r - bp)$ expressed as

[Eq. 1], where ε is the time elasticity of p . Considering that $u = \ln t$, this model has an explicit solution:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha_1 u + \alpha_0, \text{ or } \text{logit}(p) = [\text{Eq. 2}],$$

Equation 1 describes, in an easy way, the numerical progression of the proportion of localities infected in an epidemic over time. The time-elasticity corresponds to the percentage variation of the proportion of infected localities with an infinitesimal change in time, independent of the temporal scale used. The function p can be expressed as

$$p = \frac{t^{\alpha_1} e^{\alpha_0}}{1 + t^{\alpha_1} e^{\alpha_0}} = \frac{1}{1 + (t^{\alpha_1} e^{\alpha_0})^{-1}} \quad [\text{Eq. 3}], \text{ and analogously}$$

$$\varepsilon = \frac{\alpha_1}{1 + t^{\alpha_1} e^{\alpha_0}} = \frac{r}{1 + t^{\alpha_1} e^{\alpha_0}} \quad [\text{Eq. 4}]. \text{ In this model,}$$

the proportion of infected localities increases to an asymptotic value of $p = 1$ (i.e., 100% of the countries were infected), and the elasticity decreases linearly with the proportion of infected localities and decreases non-linearly with time (Fig. 3).

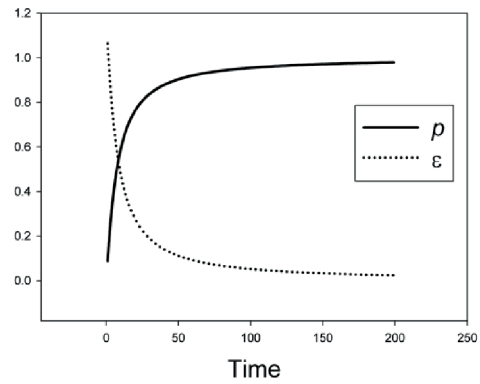
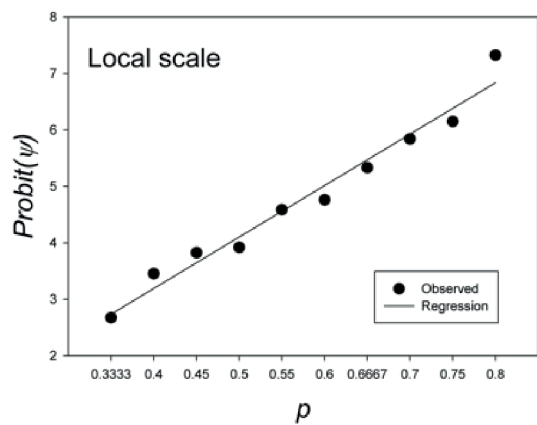


Figure 3. Progression of the proportion of infected localities (p) and the elasticity (ε) in the model (Eq[3] and Eq[4].

Determining the percolation threshold (p_c)

The probit model had a good fit without significant distortions along the different values of p at the two scales. At a global scale, the regression between $probit(\psi)$ and p was $probit(\psi) = 4.327p + 2.449$ ($R^2 = 0.984$, $F_{1,17} = 1049.60$, $p < 0.001$). The percolation threshold ($p_c \approx p_{50}$) was $p_c = 0.590 \pm 0.231$ (\pm standard deviation). At a local scale, for USA, the regression was $probit(\psi) = 8.881p - 0.319$ ($R^2 = 0.967$, $F_{1,8} = 236.47$, $p < 0.001$), with a $p_c = 0.599 \pm 0.113$ (Fig. 4).



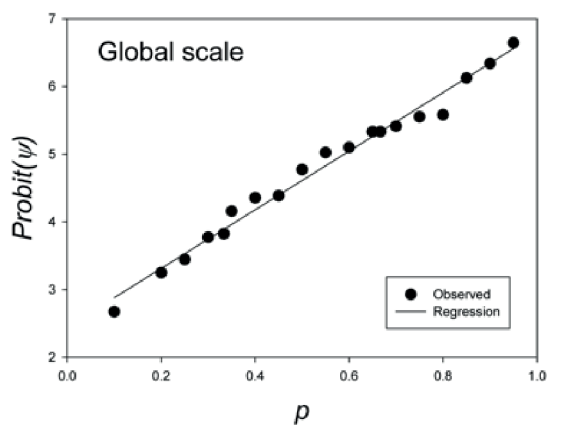


Figura 4. Probit transformation of the probability of percolation ($probit(\psi)$) as a function of the proportion of infected localities (p) at local and global scales. The solid line is the regression line, and the points are those obtained by the simulations.

The critical time of percolation

At the two different scales, we obtained percolation thresholds p_c that were not different from the percolation threshold of a square grid (= 0.5927..) ($t_{17} = 0.05, p > 0.05$ and $t_8 = 0.15, p > 0.05$ for the global and local scale, respectively). Then, substituting into [Eq. 2], we obtain

$$\ln\left(\frac{p_c}{1-p_c}\right) = \alpha_1 \ln t_c + \alpha_0 \text{ or } t_c = \frac{\left(\frac{p_c}{1-p_c}\right)^{\frac{1}{\alpha_1}}}{e^{\frac{\alpha_0}{\alpha_1}}}$$

[Eq. 5]. As an example, if we approximate $p_c \approx 0.5$, then t_c would simply be $t_c = e^{-\frac{\alpha_0}{\alpha_1}}$.

Discussion

One of the transcendental aspects of epidemiology is attempting to predict the progression of infectious diseases. This attempt is usually realized by using mathematical models that predict the progression of cases over time and deriving some relevant parameters, such as the reproductive number (R_0),

doubling time, and transmissibility (β) (6-14). However, these models do not include the spatial dimension of this progress (although others, such as diffusion and network models, do (Liu & Xiao 2013, Pellis et al. 2015); additionally, they do not include the connectivity conditions that can be established between distant regions—these factors are very relevant today in ecology, epidemiology and other scientific fields (Grassberger 1983, 1991, Miller 2009).

In recent decades it has placed special emphasis on the role of population mobility and networks connection by transport airlines in the spread of epidemics (Colizza et al. 2005, 2007a, 2007b, Vespignani 2009, Balcam et al. 2009, 2011,2012, Ajelli et al. 2010, Goncalves et al. 2013, Gomez et al. 2014, Merler et al. 2015, Schum et al. 2015). These models have been explored agent based stochastic spatially explicit discrete-time simulation models and stochastic metapopulation models (GLEaM) simulating the global spread of epidemics and determining the threshold below the disease vanishes and also a second threshold defines the criteria that permit an epidemic to move out of the giant strongly connected component and to invade the populations of the sink nodes (Schumm et al. 2015). These models have shown a good fit to the propagation of different diseases such as Influenza AH1N1, AH5N1, SARS and Ebola (Colizza et al. 2006, 2007, Gomes et al. 2014, Merler et al. 2015). The focus of these models is the spatial spread in time, while our model only uses the number of infected localities and wondered when this number becomes uncontrollable as a result of having crossed the threshold established by the percolation of the geographic space.

Percolation, being a threshold phenomenon, allows for an explanation of abrupt changes in the propagation of water, gases, parasites, fire and other materials, and it is relevant in the spread of epidemics.

Our model of epidemic progression is an easy model that relates the increase in the proportion of infected localities over time. It not only proposes a continuous spatial progress of the epidemic like other percolation models that are useful at local scale, only uses the percolation threshold to determine the time in which this occurs, and agrees with previous empirical studies of the propagation of the AH1N1-2009 Influenza realized in Chile and Argentina (Canals & Canals 2010, Canals 2010, Cuestas et al. 2011). For example, the empirical fit

using probit models and relating the proportion of infected countries and time showed a relatively good fit at the beginning of this epidemic (Canals 2009); later, logistic regression between the proportion of countries infected and time had a better fit. Moreover, when the proportion of infected countries was related to the logarithm of time ($\ln t$), the determination coefficients (R^2) increased from approximately 0.7 to values that were higher than 0.94 (Canals & Canals 2010). Other later studies in Argentina showed a good fit at the local scale (Cuestas et al. 2011).

Considering countries at a global scale and states at a local scale to be geographic unities, we obtained the percolation threshold that was closest to the expected value ($p_u = 0,5927$) for a grid of square cells (Feng et al. 2008). Despite the irregular form of the cells of countries and states, the contour of the grid in our case is geographic; in addition, inside the grid, there are zones that cannot be occupied because they do not correspond to areas of land.

In previous studies (Canals & Canals 2010), we see that the percolation thresholds vary depending on the geometric forms of the cells. In the case of the states of the USA, the form is similar to squares in several states, and then, a threshold value that is similar to that of a square grid was expected. However, in the case of countries at a global scale, we obtain also a similar value, which suggests that in the case of irregular forms of cells, the threshold value converges to an average value that is similar to that of square grids.

The random changes of localities from not infected to infected established a theoretical continuity among distant localities when really there is not; for example, between Chile and the USA. However, this agrees with the role of transport network in epidemics progression, geographic continuity is established by means of global transport networks (Tatem et al. 2006). Moreover, this random change does not introduce distortions in the percolation threshold because percolation is precisely a threshold phenomenon that is independent of the path. This attribute means that regardless of the previous configurations of the infected cells, when the threshold is reached, the system will percolate.

This model is different from the classic epidemiologic models that use differential or difference equations, such as SEIR models, to estimate the number of cases over time, and more sophisticated spatial models, such as those based

on diffusion processes (Liu & Xiao 2013), to model the continuous propagation of epidemics. Also, it is different from stochastic approaches such as agent-based or GLEaM models. The advanced model is based on a spatial progression (contamination of cells) and introduces time as a variable, which allows us to estimate when the percolation will happen. At a global scale, this choice allows us to determine the instant at which the geographic barriers that contain the epidemic disappear as the epidemic changes from an epidemic outbreak to pandemics. This threshold is different to that proposed by other models. While in other models the threshold for the spread of an epidemics (ie R_0) or the threshold for the spatial spread (Balcan et al. 2012), in our model the threshold of interest is the instant in which a disease cross the entire geographic space without barriers (percolation of the system).

Our model allows us to predict the propagation but does not report the number of cases in each locality. Our model intent to predict the number of infected localities and the time of percolation, but not predicts the spatial trajectory of the spread such as GLEaM models. In this sense, these models would be complementary to propose epidemics mitigation measures. The good fit and predictive capacity of our model allows us to propose an easy method to follow and predict the spatial progression of the proportion of infected localities over time, adapting the sizes of the cells to local situations, such as cities or communities. The proposed method comprises the following steps:

- i) Obtain information on the proportion of localities infected (P) at time (t) at the beginning of the epidemic,
- ii) To perform a logistic regression between P and $\ln(t)$ [Eq 2]
- iii) To estimate the critical time of percolation t_c by [Eq 3]
- iv) To repeat steps i), ii) and iii) as the epidemic progresses

Following the curve of P vs $\ln(t)$ allows us to study the behavior of the progression of the epidemics while looking for efficient and effective mitigation and control measures. If the curve follows linear

progress (in the logit regression) without changes, the estimation of t_c will not vary, while if there are effective control measures, the curve will change, and the estimation of t_c will increase progressively (Fig. 5).

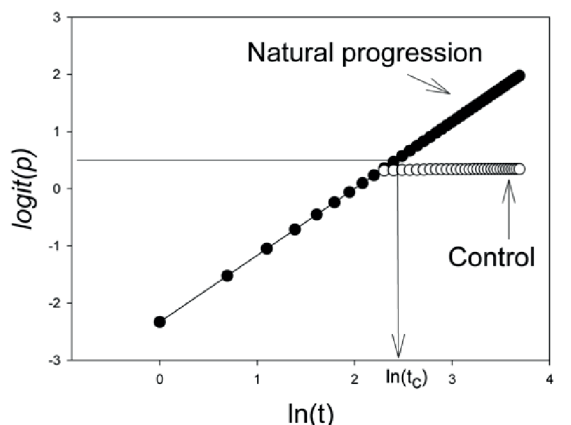


Figura 5. Hypothetical progression of an epidemic over time. $\text{Logit}(p)$ is $\ln(p/(1-p))$, with p the proportion of infected localities, and $\ln(t)$ is the natural logarithm of the time in arbitrary units. The black circles represent the natural increments in the number of localities infected; the solid line is the regression line based on only 9 points; the horizontal line and vertical arrow show the coordinates of the logit of the percolation threshold and the time at which it is reached (critical time of percolation t_c); and the white circles represent a situation in which control and mitigation measures have been successful, without reaching the percolation threshold.

Another remarkable aspect of the advanced model is that it allows us to define pandemics in a more precise form, as “the state of and epidemics in which the percolation threshold is reached (i.e., $P = 0.59$)” because it is the moment at which there is geographic continuity worldwide. It is very interesting that in the AH1N1-2009 epidemics, the WHO declared it as phase 6 (pandemic phase) on June 11, 2009, based on the human-to-human spread of the virus in at least three countries in one WHO region, and the percolation occurred on June 7, 2009 (Canals & Canals, 2010).

Acknowledgements

The present study was funded by the FONDECYT 1150514 grant to M.C. The funder had no role in devising, conducting, analyzing or reporting this study.

Referencias

Ajelli M, Goncalves B, Balcan D, Colizza V, Hu H, Ramasco JJ, et al. Comparing large-scale computational approaches to epidemic modelling: Agent-based versus structured metapopulation models. *Infect Dis.* 2010; 10: 190-213.

Anderson RM, May RM. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 1979; 280: 361-367.

Bailey N. The mathematical theory of infectious diseases and its applications. 1975; Griffin, London.

Balcan D, Colizza V, Goncalves B, Hu H, Ramasco JJ, Vespignani A. Multiscale mobility networks and the spatial spreading of infectious diseases. *PNAS.* 2009; 106 (51): 21484-21489.

Balcan D, Vespignani A. Phase transitions in contagion processes mediated by recurrent mobility patterns. *Nature Physics* 2011; 7 doi: 10.1038/NPHYS1944.

Balcan D, Vespignani A. Invasion threshold in structured populations with recurrent mobility patterns. *J Theor Biol.* 2012; 293: 87-100.

Canals M. Inicio de la pandemia AH1N1: Algebra, cálculo y geometría del contagio. *Rev Med Chile* 2009; 137: 852-856. Canals M. Análisis comparado de la dinámica epidemiológica de la Influenza A(H1N1) en Chile. *Rev Med Chile* 2010; 138: 1179-1189.

Canals M. Predictibilidad a corto plazo de casos de influenza AH1N1 basado en modelos determinísticos. *Rev Chil Infectol* 2010; 27: 114-120.

Canals M, Canals A. Percolación de la epidemia de influenza AH1N1 en el mundo: utilidad de los modelos predictivos basados en conectividad espacial. *Rev Med Chile* 2010; 138: 573-580.

Canals M, Martínez L, Firinguetti L. Dinámica ecológica de enfermedades infecciosas. I parte: Estacionalidad. *Rev Med Chile* 1989; 117: 87-94.

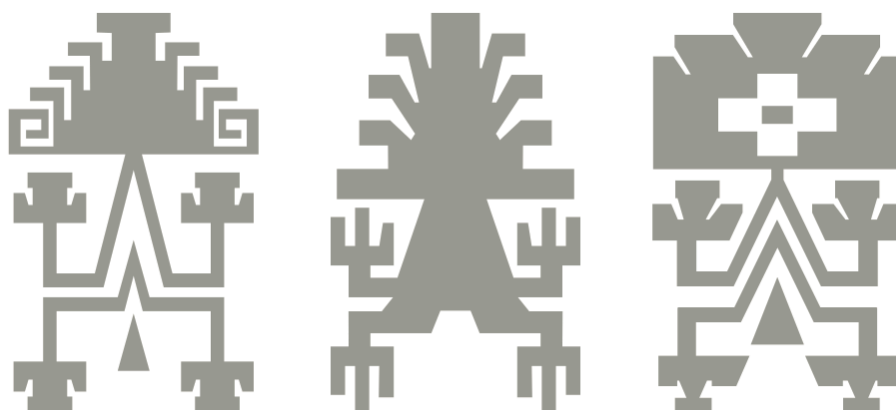
- Canals M, Martínez L, Firinguetti L. Dinámica ecológica de enfermedades infecciosas. II parte: Recurrencia epidémica. *Rev Med Chile* 1989; 117: 95-100.
- Canals M. Sarampión en Chile: Una peligrosa onda. *Rev Med Chile* 1992; 120: 585-588.
- CDC. 2015; <http://cdc.gov/> consulted September 15.
- Colizza V, Barrat A, Barthélemy M, Vespignani A. The role of the airline transportation network in the prediction and the predictability of global epidemics. *PNAS* 2006; 103(7): 2015-2020.
- Colizza V, Barrat A, Barthélemy M, Valleron AJ, Vespignani A. Modeling the worldwide spread of pandemic influenza: Baseline case and containment interventions. *PLoS Medicine* 2007; 4(1): e13.
- Colizza V, Barrat A, Barthélemy M, Vespignani A. Predictability and epidemic pathways in global outbreaks of infectious diseases: the SARS case study. *BMC Medicine* 2007; 5(34): doi: 10.1186/1741-7015-5-34.
- Cuestas E, Vilaró M, Serra P. Predictibilidad de la propagación espacial y temporal de la epidemia de influenza A H1N1 en la Argentina por el método de percolación. *Rev Arg Microbiol* 2011; 43: 186-190.
- Ebrahim GJ. Swine Flu (S-OIV) Pandemic. *J Trop Ped.* 2010; 56: 1-3.
- Feng X, Deng Y, Blote HWJ. Percolation transition in two dimensions. *Phys Rev* 2008; E78: 031136.
- Fineberg HV. Pandemic Preparedness and Response - Lessons from the H1N1 Influenza of 2009. *New Engl J Med.* 2014; 370: 1335-1342.
- Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325: 197-201.
- Gomes MFC, Pastore y Piontti A, Rossi L, Chao D, Longini I, Halloran ME et al. Assessing the international spreading risk associated with the 2014 West African Ebola outbreak. *PLoS CurrentOutbreaks.* 2015; <http://currents.plos.org/outbreaks/article/assessingtheinternationalspreadingriskassociatedwiththe2014westafricanebolaoutbreak/>
- Goncalves B, Balcan D, Vespignani A. Human mobility and the worldwide impact of intentional localized highly pathogenic virus release. *Scientific Reports* 2013; 3 810: doi: 10.1038/srep00810.
- Grassberger P. On the critical behavior of the general epidemic process and dimensional percolation. *Math Bios* 1983; 63: 157-172.
- Grassberger P. La percolation ou la geometrie de la contagion. *La Recherche* 1981; 22: 640-646.
- Hanski I. Metapopulation dynamics. *Nature* 1998; 396: 41-49.
- Heesterbeek H, Anderson RM, Andreasen V, Bansal S, De Angelis D, Dye C et al. Modeling infectious disease dynamics in the complex landscape of global health. *Science* 2015; 347: aaa4339.
- Heffernan JM, Smith RJ, Wahl LM. Perspectives on the basic reproductive ratio. *J R Soc Interface* 2015; 1-13. doi: 10.1098/rsif.2005.0042.
- Liu M, Xiao Y. Modeling and analysis of epidemic diffusion with population migration. *J Appl Math.* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/583648>.
- May R, Anderson RM. Population biology of infectious diseases: Part II. *Nature.* 1979; 280: 455-461.
- Mc Cullagh P, Nelder J. *Generalized Linear Models.* 1989; Chapman and Hall, London.
- Merler S, Ajelli M, Fumanelli L, Gomes MFC, Pastore y Piontti A, Rossi L et al. Spatiotemporal spread of the 2014 outbreak of Ebola virus disease in Liberia and the effectiveness of non-pharmaceutical interventions: a computational modeling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15: 204-211
- Miller JC. Percolation and epidemics in clustered networks. *Phys Rev* 2009; E80: 020901-5.
- Pellis L, Ball F, Bansal S, Eames K, House T, Isham V et al. Eight changes for network epidemics models. *Epidemics* 2015; 58-62.
- Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, Prabhu VS, Finelli L, Atkins CY et al. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009-April 2010). *Clin Infect Dis.* 2011; 52(1): 75-82.
- Schumm P, Scoglio C, Zhang Q, Balcan D. Global epidemic invasion thresholds in directed cattle subpopulation networks having source, sink, and transit nodes. *J Theor Biol.* 2015; 367: 203-221.
- Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol* 2006; 62: 293-343.
- Vespignani A. Predicting the behavior of techno-social systems. *Science* 2015; 325: 425-428.

Santiago de Chile

Facultad de Medicina
Universidad de Chile

10-14 de Diciembre 2017

XXIV Congreso
Latinoamericano de Parasitología



FLAP 2017

www.sociedadchilenaparasitologia.cl
www.parasitologia.cl

REVISTA

PARASITOLOGÍA LATINOAMERICANA



Órgano Oficial de la Federación
Latinoamericana de Parasitólogos