



Grupo de investigación

Echinococcosis quística

Coordinador: Dr. Eduardo A. Guarnera

Área de Inmunodiagnostico

Graciela Santillán

Área de estudios ambientales

Marta Cabrera

Área Molecular

Ariel Naidich

Departamento de Parasitología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sársfield 563. (1281) Buenos Aires. Argentina.

Integrantes del grupo de investigación

Eduardo Guarnera

Marta Cabrera

Gustavo R. Diego

Rocío J. García

Ignacio H. Velásquez

Graciela Santillán

Graciela Céspedes

Sonia Sosa

Gerardo Vaskoy

Ariel Naidich

Ariana Gutiérrez

Direcciones y contactos

Eduardo A. Guarnera

Av. Vélez Sarfield 563 (1281) Buenos Aires Argentina

E-mail address: equarnera@anlis.gov.ar

Phone/Fax number: +54 11 4301 7437

Graciela Santillán: gsantillan@anlis.gov.ar

Marta Cabrera: mcabrera@anlis.gov.ar

Ariel Naidich: anaidich@anlis.gov.ar

Áreas temáticas y perfiles de la investigación

Echinococcosis quística: inmunología, diagnóstico en personas, en los huéspedes definitivo e intermediario y en el medio ambiente, Salud Pública (estrategias de vigilancia epidemiológica y control, estudios de carga de enfermedad y costos). En estas áreas se realizan estudios de Investigación básica, experimental y de adaptación.

Evolución histórica de las actividades del grupo y logros alcanzados

La Echinococcosis quística se comenzó a tratar en el Servicio de Helmintología del Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán". En el periodo 1960-1977 se producían antígenos derivados de líquido hidatídico para realizar el diagnóstico con la intradermoreacción de Cassoni y el tratamiento desensibilizante de Calcáneo a las personas portadores de quistes. Ambos biológicos se distribuían a todos los hospitales.

Periodo 1977-1980: se discontinuó la producción de ambos antígenos y se comenzó una etapa de modernización del diagnóstico que comenzó a través de una intensa relación de trabajo con el Centro Panamericano de Zoonosis (Cepanzo) OPS/OMS. En el año 1979 se participó en el grupo de validación en terreno (Pcia de Chubut) de la técnica de Doble Difusión 5 (DD5). A partir de allí fue la técnica de referencia del Servicio.

En el año 1980 con la unión de los servicios de Helmintología y Protozoología se creó el Departamento de Parasitología.



Evolución de la producción de conocimiento en el área de Echinococcosis del Departamento de Parasitología

Periodo 1980-1993

- Se coopero en la identificación de líneas de trabajo para determinar áreas endémicas, a través de la información de historias clínicas hospitalarias (1983)
- Se integro el grupo de trabajo que valido en terreno (Prov. De Chubut) el inmunodiagnostico con Doble Difusión 5 (DD5). 1983
- Se evaluó la utilización de la DD5 para monitorear los programas de control y para identificar portadores asintomáticos entre población aparentemente sana (Prov. De Chubut). 1983
- Se realizaron investigaciones con métodos de diagnostico por imágenes y su relación con los resultados del inmudiagnóstico. 1984 y 1985
- Se analizaron las ventajas y desventajas de los métodos inmunológicos y por imágenes para el diagnostico de la Echinococcosis quística en el hombre. 1986
- Con el fin de facilitar la toma de sangre para realizar el inmunodiagnostico por personal no profesional, se desarrollo conjuntamente con el Centro Panamericano de Zoonosis la técnica de toma en escuelas con elutorios, la validación en terreno se hizo en la Provincia de Río Negro. 1986
- Se integro el grupo que valido en terreno, Provincia de Chubut, la técnica de ELISA para diagnostico clínico y para detección de portadores asintomáticos en población en riesgo. 1988 a 1990

Periodo 1993-2009

Con fines de incorporar al estudio parasitario de la Echinococcosis quística técnicas de biología molecular, se contrato un biólogo y dos técnicos para desarrollar ese campo del conocimiento

- Ese grupo caracterizó y clonó un elemento repetitivo en tandem de la cadena del ADN que se considera especifica de *E. granulosus*. 1997
- Se participo de las actividades del programa de control de la Provincia de Río Negro basado en estrategias de atención primaria. 1993
- Se evaluó la eficacia del inmunodiagnostico, DD5, comparando los resultados en población asintomática con estudios por imágenes (Radiografía, ecografía y Tomografía axial computada). 1994
- Se investigaron y analizaron variaciones intraespecificas presentes en cepas de *E. granulosus* de Argentina. 1999-2001
- El Departamento adapto y valido en terreno (Prov. De Corrientes) un método para diagnostico de la Echinococcosis canina por detección de antígenos solubles de *E. granulosus* (coproantigenos). 2000
- Se desarrollo en el Departamento un método alternativo de vigilancia epidemiológica y para determinar áreas endémicas o viviendas positivas, basado en la recolección de heces de perros dispersas en el ambiente como sustrato para el diagnostico por coproantigenos. 2000'
- El área de biología molecular del Departamento desarrollo un método para determinar la fertilidad o infertilidad de los quistes hidatídicos, basado en la extracción y caracterización de ADN de la membrana germinal. 2000
- El Departamento conjuntamente con la Cátedra de Salud Publica de la UBA, desarrollo y valido en terreno (Prov de Corrientes) el diagnóstico de hidatidosis ovina por ultrasonografía como estrategia de diagnostico parasitario, vigilancia epidemiológica y saneamiento de hatos positivos. 2001
- Comenzó sus actividades un área nueva de Echinococcosis con el objetivo de investigar a la enfermedad como un problema de contaminación biológica ambiental. Para ello se desarrollo el set de primers *EgO/DNA-IM1* (*Echinococcus granulosus* oncosphere/DNA-Malbrán Institute 1) para el diagnóstico específico de huevos de *Echinococcus granulosus*. Esta herramienta permite diferenciar entre si huevos de distintos taenidos. Con el mismo sentido Se desarrolló la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar huevos recogidos del ambiente. 2002



- El área de biología molecular logro identificar las cepas que afectan el ganado de consumo y personas de Argentina. Se aislaron las cepas siguientes: ovino común (G1), oveja de Tasmania (G2), cepa vaca (G5), capa Cabra/camello (G6) y cepa cerdo (G7). 2002
- Dado el conocimiento de que había por lo menos cinco cepas de *E. granulosus* circulantes, se estudio la evolución del quiste hidatico en las personas y la expresión clínica de cada una de ellas. 2004
- Se realizo conjuntamente con veterinarios responsables de zoonosis de provincias endémicas y profesionales de Facultades de Veterinaria de Argentina, el primer estudio de investigación de la prevalencia medida con coproantigenos en heces recogidas del ambiente, de acuerdo con la estrategia publicada por el Departamento en el año 2000.
- El grupo de biología molecular investigó acerca de la detección de *E. granulosus* en los periodos prepatentes y patentes mediante PCR en heces de canes experimentalmente y naturalmente infectados. 2006
- Esa área también investigo el polimorfismo de los genes que codifican el antígeno B de cepas que infectan al hombre en Argentina. 2005-2007.

Periodo 2009-2010

En este periodo se priorizaron los trabajos para producir conocimiento sobre los huevos de *E. granulosus* con el fin de establecer criterios de riesgo y estrategias de control y vigilancia epidemiológica basadas en la determinación de la contaminación ambiental.

- Se estableció un protocolo para identificar por métodos moleculares huevos de *Echinococcus granulosus*. Dos genes mitocondriales son particularmente útiles, el de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa y el de la NADH deshidrogenada. Preferentemente se usa CO1 dado que el ADN mitocondrial tiene una tasa de evolución relativamente rápida y es útil para la determinación de poblaciones evolutivamente cercanas; además por se haploide y no recombinar, simplifica el análisis.
- Se estableció también un sistema de diagnóstico específico para huevos colectados del ambiente. Tiene el propósito de conocer el nivel de riesgo de transmisión que tienen las áreas endémicas de Echinococcosis y el grado de contaminación local. Se empleo el set de primers *EgO/DNA-IM1*. Se compararon las secuencias publicadas de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa de los siguientes cestodes: Genotipos 1-2-4-5-6-7 de *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus oligarthrus*, *Echinococcus multilocularis*, *Taenia taeniaeformis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia pisiformis*, *Taenia hydatigena*, *Taenia crassiceps*. Se encontró que el primers de referencia identificaron la secuencia de nucleotidos específica para *Echinococcus*
- Se determinó el límite de detección de la técnica de PCR resultando de 32 pg, equivalente a 4 huevos.
- El grupo que trabaja en contaminación ambiental observo que en la tierra los huevos cambian su morfología y pierden paulatinamente la infectividad. Para evaluar correctamente el significado y antigüedad de los huevos recolectados se estableció una clasificación de los huevos de acuerdo con la morfología y su relación con la intensidad de la señal de PCR. Esta clasificación comprende cuatro tipos: Tipos I y II (morfología de preoncofera y oncosfera respectivamente) tienen señal intensa por métodos moleculares, el tipo III (postoncoferas o morfología semisenescente), muestran los ganchos desordenados, tienen señal de baja intensidad. El tipo IV (senescente) son huevos rotos o con el ADN degradado. El vitelo no da señal por PCR. Esta clasificación fue usada para establecer niveles en la contaminación biológica del ambiente
- Otra línea de análisis fue la contaminación del pelaje de los perros de las áreas endémicas. Se observó que tenían oncosferas en el pelaje aun en ausencia de parásitos en el intestino lo cual sugiere que todos los huevos adheridos no son propios, algunos serian removidos del suelo. Por este hecho, comprobado reiteradamente, se considera que el perro es un animal centinela de los sitios contaminados, muy especialmente el peridomicilio de la vivienda rural.
- Del analisis de la contaminación ambiental se reconocio a la vivienda rural como la Unidad epidemiológica de la Echinococcosis quistica El estudio de la vivienda como "unidad



epidemiológica" generó el desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico y por extensión de estrategias alternativas de control.

La investigación de la contaminación ambiental de la vivienda pretende demostrar secuencias de ADN mitocondrial específicas de *Echinococcus granulosus* en muestras de tierra, pastos, materia fecal dispersa o recién emitida de perros, agua de superficie y en el pelaje de los perros de áreas endémicas. La demostración se tomará como evidencia esencial de la contaminación del medio ambiente. Este suelo contaminado y los perros que transitan sobre él, son la fuente de infección para el hombre y los animales.

Líneas actuales de investigación

El Departamento tiene la visión que la Echinococcosis es una enfermedad parasitaria de contaminación ambiental, cuyo foco primario de emisión es la vivienda rural que se constituye en la "Unidad epidemiológica de la zoonosis". La dispersión de los huevos produce una intensa carga de huevos en el peridomicilio de esa vivienda desde donde se transmite al campo donde el parásito circula en un ciclo animal.

Las líneas del bienio 2010-2011 serán en el sentido de fortalecer el conocimiento de esa contaminación y proponer un sistema de vigilancia epidemiológica y control basado en la desparasitación de los perros de las viviendas positivas con evaluaciones que midan el avance de acuerdo con las viviendas que se tornan libres.

Publicaciones en el área de Echinococcosis quística

Publicaciones especiales

Hidatidosis en Argentina, Carga de Enfermedad, Publicación OPS/OMS Argentina. Año 2009

La Echinococcosis como Enfermedad parasitaria transmitida por alimentos
Publicación OPS/OMS Uruguay. Año 2009

Publicaciones en revistas internacionales con referato

Echinococcus granulosus antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. Muzulin PM, Kamenetzky L, Gutierrez AM, Guarnera EA, Rosenzvit MC. Exp Parasitol. 2008 Feb; 118(2):156-64. Epub 2007 Aug 3.

High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of Echinococcus granulosus. Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM, Angel SO, Zaha A, Guarnera EA, Rosenzvit MC. Parasitology. 2005 Dec; 131(Pt 6):805-15.

Patent and pre-patent detection of Echinococcus granulosus genotypes in the definitive host. Naidich A, McManus DP, Canova SG, Gutierrez AM, Zhang W, Guarnera EA, Rosenzvit MC. Mol Cell Probes. 2006 Feb; 20(1):5-10.

Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. Cavagión L, Perez A, Santillan G, Zanini F, Jensen O, Saldía L, Diaz M, Cantoni G, Herrero E, Costa MT, Volpe M, Araya D, Rubianes NA, Aguado C, Meglia G, Guarnera E, Larrieu E. Vet Parasitol. 2005 Mar 10; 128(1-2):73-81.

Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various Echinococcus granulosus strains. Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, García G, Gutiérrez A. Acta Trop. 2004 Oct; 92(2):153-9.

Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina. Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Garcia GE, Rosenzvit MC. Infect Genet Evol. 2002 Dec; 2(2):129-36.

Identification of Echinococcus granulosus eggs.



Cabrera M, Canova S, Rosenzvit M, Guarnera E. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Sep;44(1):29-34.

Echinococcus granulosus: intraspecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element.
Rosenzvit MC, Canova SG, Kamenetzky L, Guarnera EA. *Parasitology.* 2001 Oct; 123(Pt 4):381-8.

Ultrasonographic diagnosis of ovine cystic echinococcosis.
Guarnera EA, Zanzottera EM, Pereyra H, Franco AJ. *Vet Radiol Ultrasound.* 2001 Jul-Aug;42(4):352-

Echinococcus granulosus: DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and nonfertile hydatid cysts. Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, Rosenzvit MC. *Exp Parasitol.* 2000 Jun; 95(2):122-7. Erratum in: *Exp Parasitol* 2000 Dec; 96(4):260.

Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology.
Guarnera EA, Santillan G, Botinelli R, Franco A. *Vet Parasitol.* 2000 Feb 29; 88(1-2):131-4.

Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina.
Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP.
Parasitology. 1999 May; 118 (Pt 5):523-30.
Echinococcus granulosus: cloning and characterization of a tandemly repeated DNA element.
Rosenzvit MC, Canova SG, Kamenetzky L, Ledesma BA, Guarnera EA. *Exp Parasitol.* 1997 Sep; 87(1):65-8.

Evaluation of ELISA and double diffusion (DD5) test in the diagnosis of human hydatidosis in asymptomatic population] Larrieu E, Dapcich C, Guarnera E, Coltorti E, Bianchi C, Moguilansky A. *Rev Sanid Hig Publica (Madr).* 1994 May-Jun; 68(3):393-8. Spanish

Community participation and appropriate technology in the early diagnosis of human hidatidosis.
Guarnera E, Larrieu E, Coltorti E, Perez A, Cantoni G, Alvarez J, Nelsy G.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1993 Nov-Dec; 35(6):491-4. Spanish.

Hydatidosis control in the province of Río Negro, Argentina: development of primary care programs.
Larrieu E, Guarnera E, Costa MT, Alvarez J, Cantoni G, Pérez A, Giménez N. *Rev Sanid Hig Publica (Madr).* 1993 Sep-Oct; 67(5):377-84. Spanish

Detection of asymptomatic carriers of hydatid cysts: specificity increase of the immunoenzyme assay.
Coltorti EA, Fernández E, Marguet ER, Scozzina JD, Guarnera EA.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1990 Jul-Aug; 32(4):275-84. Spanish.

Field evaluation of an enzyme immunoassay for detection of asymptomatic patients in a hydatid control program. Coltorti E, Fernández E, Guarnera E, Lago J, Iriarte J.
Am J Trop Med Hyg. 1988 May; 38(3):603-7.

Seroepidemiology of human hydatidosis: use of dried blood samples on filter paper.
Coltorti E, Guarnera E, Larrieu E, Santillán G, Aquino A. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):607-

Advantages and limitations of immunologic and imaging detection methods in the diagnosis of hydatidosis Varela Díaz VM, Guarnera EA, Coltorti EA.
Bol Oficina Sanit Panam. 1986 Apr; 100(4):369-86. Spanish. No abstract available.

Immunodiagnosis of pulmonary hydatid disease in a patient with negative radiologic and scintillographic findings. Guarnera EA, Varela-Díaz VM. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79(2):149-50.



Limitations of computerized axial tomography in the localization of abdominal hydatid cysts in patients with immunodiagnostic confirmation Guarnera EA, Varela-Díaz VM. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1984 Nov-Dec; 26(6):301-6. Spanish. No abstract available.

Immunodiagnosis of abdominal hydatid disease. Difficulties in the radiological and scintillographic localization of cysts. Guarnera EA, Varela-Díaz VM. Med J Aust. 1984 Apr 14; 140(8):493-5.

Immunodiagnosis of human hydatid disease: applications and contributions to a control program in Argentina. Varela-Díaz VM, Coltorti EA, de Zavaleta O, Pérez-Caviglia H, Zabert EI, Guarnera EA. Am J Trop Med Hyg. 1983 Sep; 32(5):1079-87

Significance of hydatid immunodiagnostic surveys to health care and estimation of prevalence in the Argentine Province of Chubut.

Varela-Díaz VM, Guarnera EA, Coltorti EA, Angiorama E, Conesa H, Hernández A, Cavallo C, Morrone R, García R. Tropenmed Parasitol. 1983 Jun; 34(2):98-104.

Review of hospital cases in the assessment of hydatidosis as a health problem in the Argentine Province of Chubut.

Varela-Díaz VM, Guarnera EA, Marchevsky N, Rapoport L, Conesa H, Espínola S. Z Parasitenkd. 1983; 69(4):507-15.