

907
TV/UC
V836
2004

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

Departamento de Patología y Medicina Preventiva

EVALUACIÓN DE LA VACUNA Eg 95 CONTRA HIDATIDOSIS,
EN OVINOS.

MEMORIA DE TITULO PRESENTADA
A LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA PARA OPTAR AL
TITULO DE MEDICO VETERINARIO

IRIS OLIVIA VIVALLO CUEVAS

CHILLAN - CHILE

2004

21111

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

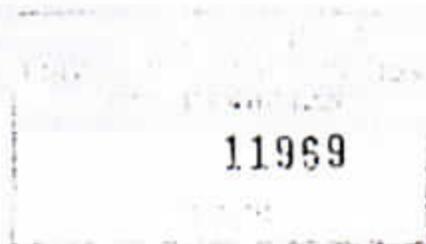
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

Departamento de Patología y Medicina Preventiva

EVALUACIÓN DE LA VACUNA Eg 95 CONTRA HIDATIDOSIS,
EN OVINOS.

Por

IRIS OLIVIA VIVALLO CUEVAS



MEMORIA DE TITULO PRESENTADA
A LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA PARA OPTAR AL
TITULO DE MEDICO VETERINARIO

CHILLAN - CHILE

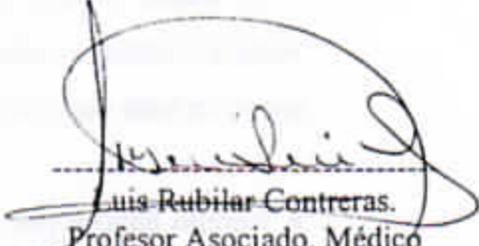
2004

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
Biblioteca



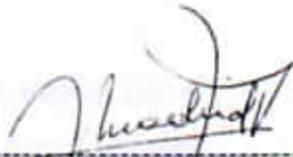
EVALUACIÓN DE LA VACUNA Eg 95 CONTRA HIDATIDOSIS,
EN OVINOS.

Profesor Patrocinante



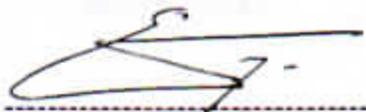
Luis Rubilar Contreras.
Profesor Asociado, Médico
Veterinario, MSc.

Profesor Guía



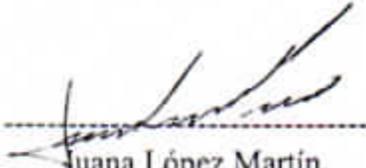
Verónica Madrid Valdebenito.
Profesor Asistente.
Médico Cirujano, MSc. M.
Enfermedades parasitarias y
tropicales

Profesor Guía



Eduardo Torrejón Godoy
Profesor Instructor,
Bioquímico.

Director Departamento de
Patología y Medicina Preventiva



Juana López Martín.
Profesor Asociado,
Médico Veterinario, MSc.
Microbiología.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas las personas que estuvieron a mi lado y me dieron la fuerza suficiente para hacer realidad este sueño.....

- A mi madre Gladys Cuevas, mi padre Carlos Vivallo, mis hermanas Natalia, Virna y Cynthia a quienes amo con todo mi corazón y agradezco infinitamente su apoyo en todo momento...
- A Aurelio Salazar por su gran amor, por hacer mi tiempo en Chillán una de las etapas más hermosas de mi vida y que a pesar de todo siempre estuvo a mi lado levantándose cada vez que no quería seguir....
- A mis amigas incondicionales Claudia Fierro, Vanessa Huerta, Marta Arévalo y Marcela Moya.
- Al Doctor Luis Rubilar por darme todas las facilidades para realizar mi tesis.
- A la Doctora Verónica Madrid y Eduardo Torrejón quienes me guiaron en esta investigación.
- Y sobre todo a Dios que me dio la posibilidad de conocer a estas grandes personas y llegar a tener este Título con un gran éxito.

A todos muchas gracias.

INDICE DE MATERIAS

CAPITULOS	PAGINA
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Etiología.....	2
1.2 Hidatidosis nacional.....	3
1.3 Epidemiología.....	5
1.4 Diagnóstico y tratamiento.....	6
1.5 Control y profilaxis.....	8
1.6 Hipótesis.....	12
1.7 Objetivos.....	12
1.7.1 Objetivo general.....	12
1.7.2 Objetivos específicos.....	12
II MATERIALES Y MÉTODO.....	13
2.1 Material biológico.....	13
2.2 Vacunación.....	13
2.3 Toma de muestras sanguíneas.....	14
2.4 Infección experimental con huevos de <i>Echinococcus granulosus</i>	14
2.5 Análisis de sueros mediante ELISA.....	16
2.6 Necropsia de corderos.....	17
2.7 Estudio histopatológico.....	17
2.8 Análisis estadístico.....	18
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
3.1 Absorbancias serológicas obtenidas en el estudio.....	19
3.2 Quistes hidatídicos hallados en la necropsia parasitaria.....	24
3.3 Ausencia de quistes hidatídicos y protección inmunológica.....	32

IV CONCLUSIONES.....	33
V RESUMEN.....	34
VI SUMMARY.....	35
VII BIBLIOGRAFÍA.....	36
VIII ANEXO.....	43

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		PAGINA
	<u>En el Texto</u>	
1	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, a los 42 días posteriores a la primera vacunación.....	19
2	Absorbancia de sueros, grupo control y vacunado, al momento de la infección con <i>Echinococcus granulosus</i> , 4 meses posteriores a la segunda vacunación.....	21
3	Porcentaje de sueros ovinos que presentaron absorbancias protectoras contra hidatidosis, en el grupo control (GI) y vacunado (GII), en los diferentes tiempos de muestreo.....	22
4	Número de quistes hidatídicos encontrados en la necropsia parasitaria, según órgano afectado, en los corderos del grupo control.....	26
5	Número de quistes hidatídicos encontrados en la necropsia según órgano afectado en los corderos del grupo vacunado.....	28
6	Tamaño promedio en milímetros de los quistes hidatídicos, grupo control.....	30
7	Tamaño promedio en milímetros de los quistes hidatídicos, grupo vacunado.....	31

8	Absorbancia de sueros ovinos vacunados, al momento del desafío con huevos de <i>Echinococcus granulosus</i> , y que presentaron quistes hidatídicos en la necropsia parasitaria.....	32
	<u>En el Anexo</u>	
1A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 0.....	43
2A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 42 posterior a la primera vacunación.....	44
3A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 150 posterior a la primera vacunación.....	45
4A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 180 posterior a la primera vacunación.....	46
5A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 270 posterior a la primera vacunación.....	47
6A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 330 posterior a la primera vacunación.....	48
7A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 360 posterior a la primera vacunación.....	49
8A	Absorbancia (D.O.) de los sueros del grupo control y vacunado, en el día 390 posterior a la primera vacunación.....	50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		PAGINA
	<u>En el Texto</u>	
1	Porcentaje de absorbancias del grupo control y vacunado que tuvieron una lectura superior o igual al suero estándar (positivos), según tiempo de muestreo.....	23
2	Corte histológico de quiste hidatídico ubicado en el pulmón de un ovino del grupo control. Aumento 4X. Tinción hematoxilina eosina. De izquierda a derecha se indica: membrana germinativa, membrana laminar, células inflamatorias, alvéolos pulmonares.....	25
3	Hígado y pulmón con quistes hidatídicos, obtenidos en la necropsia de los corderos. Grupo control.....	27
4	Hígado y pulmón sin quistes, obtenidos en la necropsia de los corderos. Grupo vacunado.....	29

I. INTRODUCCION

Las zoonosis parasitarias constituyen un índice del subdesarrollo, en cuya raíz se encuentra la ignorancia e incultura de los distintos niveles de la población, se acompañan de una alta morbilidad, de una importante tasa de mortalidad, sufrimientos y daños para las personas enfermas y la comunidad (Neghme, 1983).

La hidatidosis es un parasitismo de la comunidad humana y sus animales (FAO, citado por Rivera *et al.*, 1998), causada por el estado larvario del *Echinococcus granulosus* (Karaman *et al.*, 2002), que tiene como hospedador definitivo de mayor importancia epidemiológica al perro. El hombre y los animales de producción son hospedadores intermediarios que desarrollan la forma quística de la enfermedad, principalmente en el hígado y pulmón (Acha y Szyfres, 2001).

La hidatidosis es una ciclozoonosis de amplia distribución mundial. En el continente americano la infección prevalece principalmente en Argentina, Uruguay, Chile, Bolivia, Perú, Colombia y en la región sur de Brasil, áreas donde ocasiona graves alteraciones económicas y de salud pública (Vargas *et al.*, 1994). Su presentación se relaciona con la ganadería de régimen extensivo, con infraestructura sanitaria deficiente, asociada generalmente a comunidades con bajos niveles socioeconómicos y ausencia de educación sanitaria. (Sánchez *et al.*, citado por Rivera *et al.*, 1998). Para la ganadería, los perros son un recurso indispensable, están en estrecho contacto con sus amos y son alimentados con las vísceras del ganado que es sacrificado en el domicilio (Raposo *et al.*, 1985).

La enfermedad ocasiona pérdidas económicas debido a los gastos de protección y restauración de la salud del hombre, como también por concepto de decomiso de vísceras de animales con quistes hidatídicos. Se ha estimado que cada bovino con hidatidosis rinde 4 kilos menos de carne y 2 kilos menos de grasa, además de una depreciación en la calidad de la carne, que reduce el valor del animal en un 20%. Se ha

I. INTRODUCCION

Las zoonosis parasitarias constituyen un índice del subdesarrollo, en cuya raíz se encuentra la ignorancia e incultura de los distintos niveles de la población, se acompañan de una alta morbilidad, de una importante tasa de mortalidad, sufrimientos y daños para las personas enfermas y la comunidad (Neghme, 1983).

La hidatidosis es un parasitismo de la comunidad humana y sus animales (FAO, citado por Rivera *et al.*, 1998), causada por el estado larvario del *Echinococcus granulosus* (Karaman *et al.*, 2002), que tiene como hospedador definitivo de mayor importancia epidemiológica al perro. El hombre y los animales de producción son hospedadores intermediarios que desarrollan la forma quística de la enfermedad, principalmente en el hígado y pulmón (Acha y Szyfres, 2001).

La hidatidosis es una ciclozoonosis de amplia distribución mundial. En el continente americano la infección prevalece principalmente en Argentina, Uruguay, Chile, Bolivia, Perú, Colombia y en la región sur de Brasil, áreas donde ocasiona graves alteraciones económicas y de salud pública (Vargas *et al.*, 1994). Su presentación se relaciona con la ganadería de régimen extensivo, con infraestructura sanitaria deficiente, asociada generalmente a comunidades con bajos niveles socioeconómicos y ausencia de educación sanitaria. (Sánchez *et al.*, citado por Rivera *et al.*, 1998). Para la ganadería, los perros son un recurso indispensable, están en estrecho contacto con sus amos y son alimentados con las vísceras del ganado que es sacrificado en el domicilio (Raposo *et al.*, 1985).

La enfermedad ocasiona pérdidas económicas debido a los gastos de protección y restauración de la salud del hombre, como también por concepto de decomiso de vísceras de animales con quistes hidatídicos. Se ha estimado que cada bovino con hidatidosis rinde 4 kilos menos de carne y 2 kilos menos de grasa, además de una depreciación en la calidad de la carne, que reduce el valor del animal en un 20%. Se ha

comprobado en ovinos y cerdos muy parasitados una alteración en la composición de la carne con aumento del contenido de agua, disminución de proteínas y glucógeno. Ovejas con quistes hidatídicos producen menos leche, tienden a parir pocas crías, el peso de los corderos al nacer y su desarrollo es de un 20 a 30% menor que los de madres no infectadas, tienen bajos niveles de conversión alimenticia y una pobre calidad y rendimiento del vellón (Acha y Szyfres, 1986).

1.1. Etiología

La equinocosis es la infección del canino por el céstodo *Echinococcus granulosus* (Batsch, citado por Salazar, 2002), vive adherido a las vellosidades de la mucosa del intestino delgado del hospedador definitivo (Lloyd, 2003). Las proglótidas grávidas se desintegran y eliminan los huevos junto con las heces del perro, contaminando el ambiente (Soulsby, 1987).

Cuando los hospedadores intermediarios ingieren los huevos, éstos eclosionan en el intestino delgado y liberan el embrión hexacanto, que atraviesa activamente las vellosidades intestinales, vía porta-linfática llegan al hígado donde pueden fijarse. Los que logran avanzar vía sanguínea llegan al corazón derecho y pasan a la circulación pulmonar (Jensen, 2001¹). En algunos casos, cuando se trata de una infección masiva, las oncósferas pasan a la circulación general y llegan a otros órganos como riñones, bazo, musculatura cardíaca, huesos, etc. (Borchert, 1981; Karaman *et al.*, 2002). Una vez en el lugar de asiento definitivo, se inicia el desarrollo del metacéstodo que origina el quiste hidatídico (Jensen, 2001).

Hospedadores intermediarios que se han infectado con *Echinococcus granulosus* desarrollan una fuerte inmunidad a las reinfecciones, lo que permite la destrucción de

¹ Jensen, O, 2001. Inmunoprotección en ovinos, Investigaciones Vacuna Eg95 en Argentina. En: Seminario Internacional de Hidatidosis, 4 de Septiembre del 2001. Universidad de Concepción, Los Angeles, VIII Región, Chile. Doc. no publicado.

oncósferas cuando se produce una nueva ingestión de huevos. Los embriones contienen una proteína específica que cuando está expresada en la superficie se combina con el anticuerpo específico desarrollado por el hospedador, que en presencia del complemento dañan la membrana plasmática del embrión, lo que impide a la oncósfera convertirse en metacéstodo (Heath y Holcman, 1997; Zhang *et al.*, 2003).

El quiste hidatídico es infectante para el hospedador definitivo cuando se forman las vesículas prolíferas que contienen los protoescólex, sin embargo, no todos los quistes desarrollan estas estructuras, Thompson en 1977 encontró que el 27% de los quistes de caballo y el 15% de los quistes de oveja eran estériles, los de las vacas y cerdos son estériles generalmente. La esterilidad de los quistes se refiere a la no-producción de escólices y la no-producción de cápsula prolífera (Soulsby, 1987).

El ciclo se cierra cuando ocurre la infección del hospedador definitivo mediante la ingestión de vísceras o tejidos de hospedadores intermediarios parasitados por los metacéstodos fértiles (Cordero *et al.*, 1999). Los protoescólices se evaginan, penetran profundamente entre las vellosidades de las criptas de lieberkühn y alcanzan la madurez entre los 47 y 61 días, iniciando el ciclo de postura de huevos (Soulsby, 1987).

1.2. Hidatidosis nacional

La hidatidosis es la zoonosis parasitaria más importante de Chile (Aliaga y Oberg, 2000) es endémica en el país, presentándose desde el extremo norte hasta el extremo sur. Sin embargo, su distribución geográfica no es homogénea ya que algunos de sus hospedadores intermediarios, el ganado bovino y especialmente el ovino, es mucho más abundante en ciertas zonas del país, concentrándose en consecuencia la parasitosis en zonas ganaderas (Serra *et al.*, 1996).

En Chile, la hidatidosis humana sigue siendo una parasitosis endémica de importancia epidemiológica y económica social (Inostroza *et al.*, 1989). Es una patología de notificación obligatoria desde 1951, sin embargo, uno de los problemas que existe para

evaluar la situación en las regiones del país es la subnotificación, tanto humana como en los animales de abasto (Serra *et al.*, citado por Aliaga y Oberg, 2000). Las cifras oficiales se basan en egresos hospitalarios, pero si se agregan las autopsias y se realizan estudios serológicos en personas aparentemente sanas, las cifras serían 50 a 100 veces mayores (Muñoz *et al.*, 1999).

De acuerdo a la información del Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud, entre los años 1989 y 1998 se notificó un promedio de 320 casos anuales de hidatidosis humana (Schenone *et al.*, 1999). La mortalidad nacional se ha mantenido estable en los últimos años en aproximadamente 0,3 por cien mil habitantes, con una disminución importante en el 2002 donde llegó a 0,16/100.000 habitantes (Child *et al.*, 2003).

La mayoría de los casos proceden de comunas rurales donde se dan las condiciones favorables para que exista una estrecha convivencia entre hombre y perro (Rubilar *et al.*, 1985). Las regiones más afectadas a través del tiempo han sido clásicamente la del Maule, Magallanes y Aysén. (Ramírez, citado por Serra *et al.*, 1996).

Respecto a la hidatidosis animal, las especies de animales que presentan el estado larvario de *Echinococcus granulosus* en Chile son: caballo, bovino, oveja, cabra, llama, alpaca y el cerdo (Alcaino y Gorman, 1999).

Según estadísticas del Ministerio de Salud, la segunda patología con mayor porcentaje de decomisos en todas las especies animales durante el año 2000, fue la hidatidosis (5,59%). Cabe destacar que el porcentaje de animales faenados afectados con el metacéstodo ha disminuido un 1,29 % desde 1996 (Zúñiga *et al.*, 2000).

En la especie bovina el porcentaje de presentación de hidatidosis ha aumentado de un 15,71% en 1999 a un 24,12 % en el 2000, siendo este el valor más alto desde 1996; la mayor frecuencia de decomiso en esta especie se presentó en las regiones IV, V, IX, XI (Zúñiga *et al.*, 2000).

Los caprinos representan la segunda especie más afectada por hidatidosis, en el año 2000, del total de animales faenados el 9,27% presentó quistes hidatídicos (Zúñiga *et al.*, 2000).

A partir de 1996 ha disminuido en forma significativa la prevalencia anual de hidatidosis en la especie ovina, en el 2000 se registró un 2,26%. Llama la atención la situación de la XII Región donde se faenó en promedio el 80% del total nacional de ovinos, la tasa de prevalencia regional fue de un 0,87% en esta especie. Esta situación refleja los resultados del programa de control de la hidatidosis, implementado en esta región desde 1979 (Zúñiga *et al.*, 2000).

En 1996, las regiones que destacaron por sus altas tasas de prevalencia hidatídica animal fueron: Aysén, Araucanía y Los Lagos, con tasas muy superiores al promedio nacional (Serra *et al.*, 1996).

1.3. Epidemiología

Uno de los factores de mayor interés epidemiológico es la cantidad de huevos eliminados y su distribución en el medio ambiente, lo que tiene relación con el número de ejemplares presentes en el intestino del hospedador definitivo y el ritmo de eliminación de las proglótidas grávidas (Cordero *et al.*, 1999). El número relativamente pequeño de huevos de cada ejemplar se equilibra biológicamente, debido a que la infección con la vesícula larvaria equinocócica, que contiene un gran número de escólices, da origen a la producción de centenares de adultos en el hospedador definitivo (Cordero *et al.*, 1999).

El *Echinococcus granulosus* es prevalente en áreas rurales donde la presencia simultánea de perros y ganado, unido a la falta de conocimiento del hombre, producen las condiciones favorables para la transmisión del parásito. La prevalencia de equinocosis canina es el más claro índice de extensión de la infección y es el factor determinante de la existencia de hidatidosis en un área (Rubilar *et al.*, 1985).

El ovino es considerado el hospedador intermediario más importante debido a su distribución, sus hábitos de pastoreo, la frecuencia de su parasitación, la fertilidad de sus quistes, la necesidad de contar con perros para su manejo y porque es faenado frecuentemente para el consumo doméstico. En las regiones donde predomina el caprino y forma parte de una economía de subsistencia, con pastoreo a campo abierto, encierre nocturno y el sistema pastoril de veranada-invernada puede constituir el ciclo parasitario perro-caprino (Lamberti *et al.*, 1999; Jensen, 2001).

En general, los hábitos alimentarios de los hospedadores intermediarios, la crianza de ganado con una alta población de perros además del beneficio domiciliario de animales, la mala disposición final de vísceras y el comportamiento humano que posibilita el acceso de los perros a las vísceras infectadas, son factores que en conjunto determinan la existencia de un alto riesgo de infección parasitaria (Rubilar *et al.*, 1998; Cordero *et al.*, 1999; Larrieu *et al.*, 2000b).

1.4. Diagnóstico y tratamiento.

Para el diagnóstico en los hospedadores definitivos todavía se utiliza el bromhidrato de arecolina en dosis de 2 a 4 mg/kg pv, al 1,5%, prueba que presenta una sensibilidad de 78 % (González *et al.*, 1998; Rubilar *et al.*, 1998; Chuquisana *et al.*, 2000). Las técnicas sustitutivas como la detección por copro-antígeno mediante ELISA presenta fácil operatividad, con una sensibilidad parecida a la arecolina, que se incrementa a 95% cuando la biomasa de *Echinococcus* en los perros supera los 100 ejemplares (Jiao *et al.*, 1999). La técnica de PCR detecta el DNA del *E. granulosus* aislado de los huevos o tejidos del parásito eliminados en la materia fecal, la sensibilidad fluctúa entre 89 % y 94% cuando hay más de 100 parásitos con proglótidas grávidas y baja a un 70% cuando el número de ejemplares es inferior a 10 parásitos inmaduros (Cabrera, 2002). Actualmente el inmunodiagnóstico a través de ELISA, constituye un método alternativo que permite realizar el diagnóstico durante el período de prepatencia del parásito (Cordero *et al.*, 1999; Benito *et al.*, 2001; Kittelberger *et al.*, 2002). El único método absolutamente seguro para determinar la infección en el perro es la necropsia, sin

embargo, por el grado de desaprobación en la población para aplicar esta técnica, no es conveniente su uso, salvo en casos excepcionales (Shantz, 1973).

La fase quística rara vez se diagnostica antemortem en los animales domésticos (Soulsby, 1987). Como consecuencia de la falta de síntomas característicos el diagnóstico apenas es posible, aún cuando se resiente el desarrollo y la capacidad de producción de los animales, el resultado de la necropsia o el hallazgo tras el sacrificio es decisivo (Borchert, 1981).

En humanos el diagnóstico se realiza clínicamente, cuando el paciente presenta síntomas de afección de algún órgano, lo que se corrobora con técnicas serológicas, de imagen o como hallazgo dentro de otros estudios (Canales *et al.*, 1994). Entre las técnicas usadas destacan la hemaglutinación indirecta (RHAI) (Apt *et al.*, 2000, Zamorano *et al.*, 2000), inmunofluorescencia indirecta, inmunoprecipitación y doble difusión de arco 5 (DD5). En los últimos años se han usado técnicas como ELISA e inmunoelectrotransferencia (Retamal *et al.*, 1994).

Con relación al tratamiento de la equinocosis canina, el fármaco de elección es el praziquantel en dosis de 5 mg/Kg. pv, vía oral, un solo tratamiento permite eliminar el 100% de los adultos. Jiao *et al.*, (2003) indican la posibilidad de implantar vía subcutánea un bolo de liberación lenta de praziquantel que se puede utilizar como medida principal para el control de la equinocosis en áreas endémicas donde la dosificación cada 45 días se hace difícil. Esta droga se ha utilizado en muchos países de manera exitosa en diversos programas de control, aplicándolo vía oral en forma estratégica cada 45 días. (Cordero *et al.*, 1999).

La forma quística en los animales intermediarios, por lo general no se trata, sin embargo, en la hidatidosis humana se emplean muchas alternativas para su tratamiento, Pinto (1994) indica el uso de antiparasitarios como mebendazol, albendazol y praziquantel; también se aplican otras técnicas como radioterapia, punción del quiste con aspiración

del líquido, inyección de sustancias protoescolicidas y reaspirado (PAIR) y procedimientos quirúrgicos (Apablaza *et al.*, 1992).

1.5. Control y profilaxis

Antes de iniciar un programa de control de hidatidosis en un área determinada, es necesario realizar un análisis de costo/beneficio y si este resulta positivo justifica el financiamiento para su implementación, sin embargo, las grandes pérdidas económicas que produce la enfermedad son suficientes para aprobar estos proyectos (Larrieu *et al.*, 2000a). Aunque las medidas preventivas son simples, la prevención de la enfermedad es una tarea difícil y compleja, porque debe influir en un comportamiento social que está profundamente arraigado y que se asocia a las condiciones socioculturales de la población humana (Conchedda *et al.*, 2002).

Varios países geográficamente aislados han logrado eliminar el parásito de su territorio, tales como Islandia (Schwabe, 1984), Nueva Zelanda (Gemmell *et al.*, 1986; Brezo y Kasper, 1991) y Chipre (Papadopoulos, 1985; Polydorou, 1992; Economides, 1994) (Heath y Holcman, 1997). En la mayoría de las regiones endémicas, el control no ha sido posible debido a la inestabilidad política, movimiento de hospedadores definitivos e intermediarios a través de las fronteras, dificultad de acceso a los hospedadores definitivos, la necesidad de algunos países de alimentar los perros con restos animales y la dificultad de mantener un tratamiento antihelmíntico regular de todos los perros hasta por 20 años, como Nueva Zelanda que mantuvo un tratamiento antiparasitario de perros por 23 años (Heath y Holcman, 1997).

En Chile, los programas de control han tenido como meta reducir o eliminar la infección del hombre y los animales. Los métodos tradicionales son mantener reducida la población canina, tratamiento regular de los perros con praziquantel, reglamentar el faenamiento de animales, destrucción segura de vísceras infectadas y constante educación sanitaria en todos los niveles de la comunidad (EL CONTROL DE LA..., 1999). Los programas basados en estos métodos requieren de un esfuerzo intenso por

muchos años para lograr disminuir las tasas de infección, existiendo siempre la posibilidad que frente a cualquier interrupción reaparezcan nuevas infecciones en los hospedadores intermediarios que proporcionan una fuente de infección para la transmisión del parásito (Lightowlers *et al.*, 1999; Lightowlers *et al.*, 2002).

Los estudios sobre inmunoprofilaxis como método de control, se han centrado fundamentalmente en la prevención de la infección por metacéstodos en los hospedadores intermediarios, ya que en ellos se genera una fuerte inmunidad a la reinfección. Por el contrario, los progresos obtenidos en el desarrollo de vacunas frente a céstodos adultos son escasos, pues la inmunidad protectora que genera la infección en los hospedadores definitivos es escasa (Cordero *et al.*, 1999).

En los últimos años se ha desarrollado en Nueva Zelanda y Australia una vacuna recombinante para proteger al hospedador intermediario contra la hidatidosis, los resultados obtenidos en diferentes ensayos indican altos niveles de protección contra el desarrollo del metacésto (Zhang *et al.*, 2003).

La vacuna experimental que protege a los ovinos contra primo infecciones e infecciones repetitivas por *E. granulosus*, está basada en un clonado de antígeno recombinante definido, designado Eg 95, obtenido a partir de oncósferas del parásito y expresados en *E. coli* (Lightowlers *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003). Es una preparación proteica purificada, no infecciosa, no tóxica, no contaminante y producida mediante ingeniería genética. La vacuna es administrada en forma subcutánea, con una dosis de 50 µg de proteína Eg 95 y 1 mg de adyuvante Quil A, en un volumen de 2 ml (Jensen *et al.*, 2001²).

² Jensen, O; P. Sánchez, J. Iriarte, R. Fernández y E. Fernández, 2001. Control de Hidatidosis en el Hospedero Intermediario. En: Seminario Internacional de Hidatidosis, 04 de Septiembre del 2001. Universidad de Concepción, Los Angeles, VIII Región, Chile. Doc. no publicado.

Quil A se degrada en condiciones alcalinas, por lo que la vacuna tiene que ser reconstituida en un ambiente levemente ácido (pH 6,8). La temperatura recomendada para almacenarla es de 4°C, pero se mantiene mejor a -20° C hasta por un mes y tiene una vida útil indefinida cuando está almacenada a -80° C (Heath y Lightowlers, 2001³).

La vacuna no tiene ningún efecto en los quistes ya establecidos, por lo cual el plan de vacunación debe iniciarse en los animales nacidos en la temporada, que tienen menor riesgo de infectarse. Como en la mayoría de las vacunas, los animales jóvenes necesitan ser vacunados dos veces, con un intervalo de 1 mes entre vacunaciones, posteriormente se recomienda una revacunación anual en el caso de los reproductores, debido a que la inmunidad generada perdura 12 meses (Heath y Holcman, 1997; Zhang *et al.*, 2003).

La vacuna Eg 95 ha sido probada para evaluar su potencia supervisando la respuesta serológica en ovejas control, en comparación con el suero de ovejas inmunizadas y protegidas. Normalmente se han usado 10 animales vacunados y 10 control. De los 10 animales vacunados se espera que 8 alcancen un nivel de inmunidad que sea coincidente con la protección completa demostrada en la necropsia para aceptar la vacuna (Heath y Lightowlers, 2001).

Se ha demostrado que la vacuna es segura y eficaz en bovinos, yaks, ovejas y cabras. Estudios realizados en ovejas y vacas preñadas comprobaron que la vacuna Eg 95 no provoca efectos secundarios como abortos, partos con crías muertas o efectos teratogénicos. Otra característica significativa de la vacuna Eg 95 es la inmunidad que se transfiere en forma pasiva en el calostro a los recién nacidos con anticuerpos de las madres vacunadas (Zhang *et al.*, 2003), la protección se mantiene cerca de 3 meses en corderos y 4-5 meses en terneros, la respuesta del recién nacido se reduce si se le vacuna en presencia del anticuerpo materno a las 8 y 12 semanas, pero vacunaciones entre las 12 y 20 semanas no parecen ser afectadas por la presencia del anticuerpo materno.

³ Heath D. y Lightowlers M. 2001. Progress in control of Hydatidosis using vaccination. En: Seminario Internacional de Hidatidosis. Los Ángeles, VIII región, Chile. Doc. no publicado.

protector residual. Actualmente en Nueva Zelanda se realizan ensayos para determinar el efecto de la vacuna durante la fecundación de ovejas (Heath y Lightowlers, 2001).

Se han vacunado corderos y cabritos a las 4 y 8 semanas de edad y se ha demostrado que no hay problemas con la salud de los animales jóvenes (Heath y Lightowlers, 2001).

En la provincia de Xinjiang, China se hicieron pruebas con la vacuna obteniendo una protección de 90% y 97% en los ovinos inmunizados (Heath y Lightowlers, 2001). En Argentina la vacuna experimental Eg 95 logró un elevado nivel de protección ante la infección por *E. granulosus*, 82% con una dosis, 97% con dos dosis y 100% con tres dosis (Jensen *et al.*, 2001).

En Australia se realizaron ensayos experimentales para evaluar la eficacia de la vacuna Eg 95 en ovinos infectados con huevos de *Echinococcus granulosus* obtenidos en 3 países, en el primer caso se usaron huevos recuperados de un ciclo perro-ovino de Nueva Zelanda, en este caso la vacuna Eg 95 indujo protección completa frente a la infección del desafío en el 80% (4/5) de los animales vacunados. En un segundo ensayo se utilizaron huevos obtenidos del ciclo dingo-wallaby de Australia, la protección de la vacuna fue de un 96 %. Un tercer ensayo se realizó con parásitos obtenidos del ciclo perro-ovino de Argentina y se obtuvo una protección en los animales vacunados de un 99%. El alto nivel de protección alcanzado en los tres ensayos sugiere que la vacuna Eg 95 tiene un efecto positivo a pesar de la variabilidad genética del parásito, por lo que puede ser usada como medida de control eficaz contra la enfermedad hidatídica en cualquier país (Lightowlers *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003).

Con el propósito de evaluar la vacuna Eg 95 en Chile, específicamente en la VIII Región, se estableció contacto con el Doctor David Heath, científico de Wallaceville Animal Research Centre en Nueva Zelanda, quien proporcionó la vacuna, el antígeno estandarizado y el antiantígeno para el ensayo.

1.6. Hipótesis

El grado de protección que otorga la vacuna Eg 95, contra el estado larvario de *Echinococcus granulosus* en las vísceras de los corderos infectados experimentalmente, permite prevenir el desarrollo de quistes hidatídicos.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta protectora inducida por la vacuna Eg 95 contra la hidatidosis, en corderos de tres meses de edad, infectados experimentalmente con huevos de *Echinococcus granulosus*.

1.7.2. Objetivos específicos

- Determinar las absorbancias de los sueros en distintos tiempos de muestreo.
- Determinar el número y tamaño promedio de los quistes hidatídicos presentes en los órganos estudiados.
- Conocer el número y tamaño promedio de los quistes hidatídicos presentes en los órganos estudiados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

Para evaluar la vacuna Eg 95, se utilizaron 22 corderos que tenían 3 meses de edad al inicio de la experiencia, adquiridos en un predio libre de la parasitosis. Los animales fueron trasladados a las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, donde se realizó la investigación.

Los ovinos se individualizaron con autocrotales de color azul en la oreja izquierda con números correlativos, luego se procedió a distribuirlos al azar en dos grupos. Grupo I: Control, constituido por 10 corderos que se identificaron con un crotal naranja en la oreja derecha con el mismo número del crotal azul. Este grupo no fue vacunado. Grupo II: Experimental, compuesto por 12 corderos que se identificaron con un autocrotal de color amarillo con el mismo número del crotal azul, ubicado en la oreja derecha. Este grupo fue vacunado.

2.2 Vacunación

La vacuna Eg 95 liofilizada, fue importada desde Nueva Zelanda y está constituida por 50 µg de proteína Eg 95 y 1 mg de adyuvante Quil A.

La reconstitución de la vacuna se efectuó en el momento de la vacunación del Grupo II. Desde un matraz con 100 ml de buffer PBS a pH 6.8 se transfirieron 10 ml a un vial que contenía la vacuna Eg 95, se agitó muy suavemente, posteriormente se reaspiraron los 10 ml y se transfirieron nuevamente al matraz, se enjuagó el vial con otros 10 ml de PBS 2 veces. Una vez reconstituidos los 100 ml se mezcló suavemente y se sacó una alícuota para medir pH, en las dos vacunaciones se obtuvo un pH 6.8. El matraz se selló con tapón estéril y se cubrió con papel aluminio.

La vacunación se realizó cargando 2 ml de la vacuna reconstituida por jeringa y se inyectó en la parte anterior de la paleta derecha, vía subcutánea, el excedente de vacuna fue descartado.

La primera dosis se administró el día 0 (28 de noviembre del 2001) y la segunda dosis se aplicó 30 días después de la primera.

2.3 Toma de muestras sanguíneas

Para la determinación de las absorbancias serológicas de los corderos, se tomaron muestras de sangre, la primera se obtuvo momentos antes de realizar la primera vacunación en el día 0, luego a los 42, 150, 180, 270, 330, 360 y 390 días. Se extrajo 8 ml de sangre venosa, sin anticoagulante desde la vena yugular y se depositó en tubos de vidrio rotulados, estos tubos se pusieron en gradillas para el transporte al laboratorio, se esperó la coagulación de la muestra y se extrajo el suero que fue depositado en un nuevo tubo de vidrio, se rotuló con el número del animal y la fecha.

Los sueros fueron transportados hasta el Laboratorio de Parasitología del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción en cajas aislantes a 4° C; fueron centrifugados a 2500 rpm x 5 min. para la eliminación de sedimento, luego el suero se alicuotó para un mejor manejo y almacenaje, manteniéndolo congelado a -20°C hasta su procesamiento, mediante la técnica de ELISA.

2.4 Infección experimental con huevos de *Echinococcus granulosus*.

Para realizar el desafío de los corderos se colectaron proglótidas grávidas de *Echinococcus granulosus* de perros infectados en forma natural, en Alto Bio Bio, VIII región.

A los perros se les administró bromhidrato de arecolina al 1,5 %, en dosis de 1 ml/5kg de peso vivo, en los días previos al desafío de los corderos, cuidando las normas de bioseguridad personal como lo indica Schántz (1973).

La recolección de los parásitos se efectuó con placas petri de fondo oscuro y agua para diluir las muestras fecales. Las muestra positivas al parásito, se depositaron en envases plásticos con suero fisiológico al 0,9%; posteriormente los *Echinococcus* se ubicaron con una lupa y se extrajeron del sedimento, para depositarlos en un envase con suero fisiológico para transportarlos al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción. Con el uso de un microscopio se confirmó la presencia de huevos en los parásitos grávidos, siendo aprobados para preparar las dosis de infección.

En el laboratorio se preparó una solución preservante de 500 ml de suero fisiológico 0,9% al que se le adicionó 5 ml de penicilina G sódica, procaínica y estreptomina, que tenían una concentración de 1 millón UI, 2 millones UI y 2500 mg respectivamente.

En una gradilla se pusieron 22 tubos de ensayo a los que se le adicionó 10 ml de la solución preservante. Una vez realizada esta operación se prepararon las dosis de infección con 3 ejemplares de *Echinococcus granulosus* grávidos por tubo (1500-1800 huevos aproximadamente¹). Los tubos preparados se mantuvieron por 24 horas con el antibiótico en refrigeración, con el fin de eliminar la contaminación bacteriana que podrían tener los huevos.

Los animales de los dos grupos fueron desafiados mediante la administración de una dosis de infección de *Echinococcus granulosus*. El desafío se realizó a los 4 meses posteriores a la segunda vacunación.

¹ Jensen, O, 2001. Inmunoprotección en ovinos, Investigaciones Vacuna Eg95 en Argentina. En: Seminario Internacional de Hidatidosis, 4 de Septiembre del 2001. Universidad de Concepción, Los Angeles, VIII Región, Chile. Doc. No publicado.

2.5 Análisis de sueros mediante ELISA

El método de ELISA se realizó para determinar la respuesta protectora de los corderos. Como suero control positivo se usó un pool de sueros obtenidos de ovejas vacunadas y probadamente protegidas contra hidatidosis (por necropsia), este suero indica una reducción del 100% en el número de quistes; el suero estándar está compuesto por sueros de ovejas vacunadas que presentaron una reducción del 80% del número de quistes y el suero control negativo se obtuvo de ovejas que no fueron vacunadas contra hidatidosis y que no tenían la enfermedad. Las absorbancias obtenidas de los corderos fueron comparadas con estos sueros.

Tanto el suero control positivo como el estándar, el antígeno y el antiantígeno fueron importados desde Nueva Zelanda.

El ensayo de ELISA fue realizado en placas NUNC Maxisorp, que fueron sensibilizadas con el antígeno Eg 95 diluido en buffer carbonato por 18 hrs a 4°C, posteriormente fueron lavadas con buffer fosfato salino más Tween 20 y bloqueadas con leche descremada 5% en PBS (Blotto 5%) por 60 minutos.

Los sueros almacenados a -20°C se descongelaron y diluyeron en blotto (dilución 1/200). Se agregó 100 ul de blotto a los pocillos de las filas B hasta la H, a los pocillos de las filas A y B se agregó 100 ul de suero diluido 1/200 y se comenzó a hacer las diluciones tomando 100 ul desde los pocillos de la fila B descendiendo hasta la H y descartando los últimos 100 ul, se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces por 3 minutos con buffer de lavado. Todas las diluciones se hicieron en duplicado.

El conjugado Anti IgG se diluyó a 1:40 en Blotto, se agregó a cada pocillo 100 ul del conjugado y se incubó 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó la placa con buffer de lavado. Posteriormente se agregó a cada pocillo 100 ul de OPD (o-

2.5 Análisis de sueros mediante ELISA

El método de ELISA se realizó para determinar la respuesta protectora de los corderos. Como suero control positivo se usó un pool de sueros obtenidos de ovejas vacunadas y probadamente protegidas contra hidatidosis (por necropsia), este suero indica una reducción del 100% en el número de quistes; el suero estándar está compuesto por sueros de ovejas vacunadas que presentaron una reducción del 80% del número de quistes y el suero control negativo se obtuvo de ovejas que no fueron vacunadas contra hidatidosis y que no tenían la enfermedad. Las absorbancias obtenidas de los corderos fueron comparadas con estos sueros.

Tanto el suero control positivo como el estándar, el antígeno y el antiantígeno fueron importados desde Nueva Zelanda.

El ensayo de ELISA fue realizado en placas NUNC Maxisorp, que fueron sensibilizadas con el antígeno Eg 95 diluido en buffer carbonato por 18 hrs a 4°C, posteriormente fueron lavadas con buffer fosfato salino más Tween 20 y bloqueadas con leche descremada 5% en PBS (Blotto 5%) por 60 minutos.

Los sueros almacenados a -20°C se descongelaron y diluyeron en blotto (dilución 1/200). Se agregó 100 ul de blotto a los pocillos de las filas B hasta la H, a los pocillos de las filas A y B se agregó 100 ul de suero diluido 1/200 y se comenzó a hacer las diluciones tomando 100 ul desde los pocillos de la fila B descendiendo hasta la H y descartando los últimos 100 ul, se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces por 3 minutos con buffer de lavado. Todas las diluciones se hicieron en duplicado.

El conjugado Anti IgG se diluyó a 1:40 en Blotto, se agregó a cada pocillo 100 ul del conjugado y se incubó 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó la placa con buffer de lavado. Posteriormente se agregó a cada pocillo 100 ul de OPD (o-

phenylene diamine), se incubó en obscuridad durante 20 minutos, la reacción se detuvo con 50 μ l de ácido sulfúrico por pocillo.

La absorbancia (DO) fue leída a 490 nm en un lector de ELISA para microplaca BIO-TEK Instruments EL 311. La lectura utilizada para representar los datos fue la de la dilución 1/3200.

2.6 Necropsia de corderos

Todos los corderos fueron sacrificados 13 meses después de la infección experimental con *Echinococcus granulosus* para determinar la presencia de quistes hidatídicos en los diferentes órganos.

Los órganos examinados fueron hígado, pulmón, corazón, bazo y riñones; cada órgano fue examinado inicialmente en forma visual y mediante palpación del parénquima, posteriormente se procedió a realizar cortes longitudinales de 0,5 cm de espesor, con la finalidad de pesquisar quistes hidatídicos que se hubieran desarrollado en su interior.

A los quistes y lesiones semejantes, se les realizó cortes histopatológicos para confirmar la presencia de quistes hidatídicos.

2.7 Estudio histopatológico

Se tomaron muestras de 4 mm de espesor de cada quiste, éstos se fijaron por 24 horas en formalina al 10% tamponada, luego las muestras fueron tratadas en un procesador Shandon, modelo Citadel 1000, para posteriormente incluirlas en bloques de parafina en un centro de inclusión Microm, Modelo AP 280-3. De los bloques de parafina se obtuvieron cortes de 4 μ m con un micrótomo LEICA, modelo RM 2045 y se tiñeron con hematoxilina eosina. La observación se hizo a través de un microscopio óptico.

2.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante Chi cuadrado para comparar proporciones, Chi cuadrado de tendencias y análisis de varianza de un factor.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Absorbancias serológicas obtenidas en el estudio.

En la Tabla 1 se presentan las absorbancias que se obtuvieron de los corderos del Grupo control y vacunado a los 42 días posteriores a la primera vacunación. Los resultados se comparan con las absorbancias de los sueros estándar, control positivo y negativo.

TABLA 1. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, A LOS 42 DÍAS POSTERIORES A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunados (GII)
Positivo	1,04		1,695
Negativo	0,018		0,10775
Estándar	0,675		0,932
176	0,0175	177	1,731
179	0,138	178	2,0675
180	0,1175	182	1,9595
185	0,0635	183	0,5215
187	0,018	184	0,9225
192	0,0975	186	1,752
195	0,028	190	1,751
197	0,0295	191	1,688
198	0,127	199	2,0005
200	0,082	2	1,1575
		5	1,9105
		7	1,716
promedio	0,07185		1,598125

D.O.: Absorbancia.

GI : Grupo uno.

GII : Grupo dos.

Se observa que en el Grupo I las lecturas están muy cercanas al indicado por el suero control negativo, lo que demuestra la no protección inmunológica contra la parasitosis en los corderos controles.

En el grupo vacunado, los niveles obtenidos el día 42 para el suero control negativo fue de 0,107; el estándar 0,932 y el suero control positivo 1,695.

De los corderos vacunados 8 registraron una absorbancia mayor a la del suero control positivo, 2 presentaron valores superiores al estándar y sólo dos tuvieron un valor menor que el estándar, pero mayor que el del control negativo. De acuerdo a estos resultados el 83,3% (10/12) de los corderos presentó absorbancias mayores que el suero estándar. Lo anterior indica que 8 corderos estaban completamente protegidos frente a la infección del metacésto del *Echinococcus granulosus*, 2 corderos tenían una protección de un 80% frente al mismo y 2 registraban una protección insuficiente para no desarrollar quistes hidatídicos en caso de infección.

Según el protocolo de vacunación, si en el día 42 el 80% de los corderos vacunados presentan densidad óptica (D.O.) en 1/3200 superior a la del suero estándar se considera satisfactoria la vacuna, tal como lo indican Heath y Lightowlers (2001) en sus trabajos, donde hacen referencia a que la vacuna debe ser testada serológicamente en 2 grupos de ovinos, 10 vacunados y 10 control como mínimo, para estudiar su potencia. Si 8 de los 10 corderos vacunados presentan absorbancia que coincide con la protección parasitaria observada en la necropsia, se acepta que la vacuna protege en forma adecuada, en el ensayo se obtuvo un 83.3% sobre el estándar, por lo tanto la vacuna se consideró satisfactoria.

De acuerdo al protocolo de infección experimental de los corderos, éstos debieron ser desafiados a los 30 días posteriores a la segunda vacunación, tal como se efectuaron los ensayos de la vacuna Eg 95 en Chubut, provincia de Argentina, como lo indica Jensen (2001), sin embargo, debido a la dificultad de obtener ejemplares de *Echinococcus granulosus* grávidos en el momento oportuno, la infección experimental de los animales se realizó 4 meses después de la segunda vacunación, momento en que las absorbancias de los corderos vacunados ya habían disminuido levemente, comparado con los obtenidos el día 42 posterior a la primera vacunación, tal como se observa en la Tabla 2.

TABLA 2. ABSORBANCIA DE SUEROS, GRUPO CONTROL Y VACUNADO, AL MOMENTO DE LA INFECCIÓN CON *Echinococcus granulosus*, 4 MESES POSTERIORES A LA SEGUNDA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunados (GII)
Positivo	1,665		1,687
Negativo	0,0445		0,373
Estándar	0,7785		1,085
176	0,016	177	1,0805
179	0,044	178	1,7235
180	0,074	182	0,949
185	0,033	183	0,248
187	0,022	184	0,395
192	0,0545	186	1,141
195	0,0815	190	0,805
197	0,031	191	1,4135
198	0,0275	199	1,2615
200	0,0475	2	1,144
		5	1,579
promedio	0,0431		1,067272727

D.O.: Absorbancia.

GI : Grupo uno.

GII : Grupo dos.

En el Grupo I la lectura a la dilución 1/3200 más alta fue de 0,0815, siendo la absorbancia de todos los sueros de este grupo cercana a la obtenida por el control negativo y muy lejos de la registrada para el suero estándar; lo que indica que inmunológicamente no tuvieron protección frente al desarrollo del metacéstodo de *Echinococcus granulosus*, por lo que todos los corderos, frente a la infección con huevos del parásito, debieron desarrollar quistes hidatídicos, situación que se comprobó posteriormente cuando se realizó la inspección en la necropsia parasitaria.

En el Grupo II, el suero control negativo tenía una absorbancia de 0,373, el estándar 1,085 y el suero control positivo 1,687. Teóricamente, en el momento del desafío con *Echinococcus granulosus* sólo 1 ovino tenía una protección del 100% contra el desarrollo del metacéstodo, con una absorbancia mayor a la del suero control positivo; 6

11969

corderos estaban sobre el valor del estándar y un poco debajo del control positivo, lo que les confiere una protección estimada sobre el 80%. Sólo 4 estaban por debajo del estándar, pero siempre sobre el valor del control negativo que es un suero obtenido de ovejas sin inmunización, por lo tanto su protección inmunológica era menor del 80%.

Las absorbancias fueron determinadas en diferentes tiempos en un lapso de 13 meses. Los resultados obtenidos del grupo control y vacunado por mes con las respectivas lecturas de los sueros control positivo, negativo y estándar se presentan en el Anexo.

Se estableció el suero estándar como número de corte para indicar si los corderos tienen una cantidad suficiente de anticuerpos que sean protectivos contra el desarrollo del estado larvario del *Echinococcus granulosus*. Las absorbancias registradas por los sueros ovinos fueron comparadas con el estándar, los que estuvieron sobre su lectura se denominaron positivos y los que estuvieron por debajo se registraron como negativos a la presencia de anticuerpos protectores. De este modo se determinó el porcentaje de sueros, por grupo, en los diferentes tiempos que presentaron absorbancias sobre el suero estándar indicando protección contra hidatidosis animal (Tabla 3).

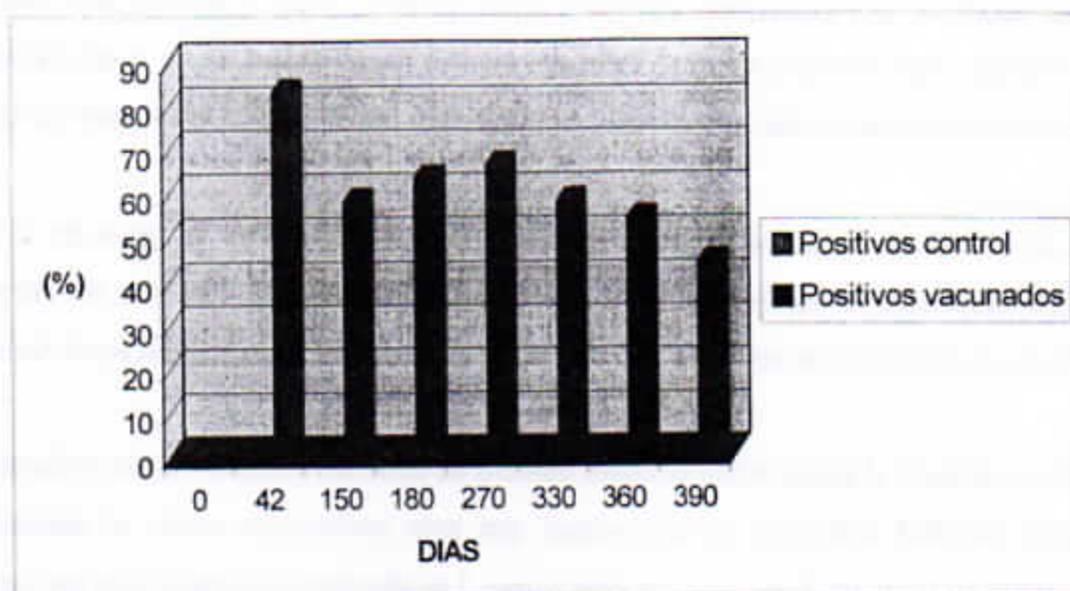
TABLA 3. PORCENTAJE DE SUEROS OVINOS QUE PRESENTARON ABSORBANCIAS PROTECTIVAS CONTRA HIDATIDOSIS, EN EL GRUPO CONTROL (GI) Y VACUNADO (GII), EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO.

días	GI	GII
0	0 ^{1a}	0 ^{1a}
42	0 ^{1a}	83 ^{2b}
150	0 ^{1a}	58,3 ^{2b}
180	0 ^{1a}	63,6 ^{2b}
270	0 ^{1a}	66,7 ^{2b}
330	0 ^{1a}	58,3 ^{2b}
360	0 ^{1a}	54,5 ^{2b}
390	0 ^{1a}	64,4 ^{2b}

* Números de superíndice distintos indican diferencias significativas en la fila ($p < 0,05$).

** Letras de superíndice distintas indican diferencias significativas en la columna ($p < 0,05$).

El porcentaje de absorbancias protectoras, en los corderos del Grupo I y II se puede observar en la Figura 1.



%; porcentaje

FIGURA 1. Porcentaje de absorbancias del grupo control y vacunado que tuvieron una lectura superior o igual al suero estándar (positivos), según tiempo de muestreo.

Se observa claramente que el máximo porcentaje de corderos que tenían una absorbancia superior al número de corte, que indica una protección contra el desarrollo del estado larvario de *E. granulosus*, en el grupo vacunado, se logra a los 42 días posteriores a la primera vacunación, este aumento en el porcentaje respecto al día 0 es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Aunque se ve una tendencia a la baja en el gráfico en los distintos tiempos, desde el día 42, en el grupo vacunado, las diferencias entre los tiempos no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$), lo que indica que la protección se mantiene en los 12 meses muestreados, tiempo después del cual se recomienda la revacunación de los animales para inducir una nueva alza de anticuerpos anti Eg 95, lo que debería practicarse en los

reproductores que son los animales que permanecen en el predio y que mantienen el riesgo de infección, esto coincide con lo indicado por Heath y Lightowlers (2001).

Las absorbancias de los corderos control siempre estuvieron bajo el que registró el suero estándar por lo cual en todos los tiempos se obtuvo un 100% de sueros negativos a protección inmunológica contra la hidatidosis en este grupo, siendo la diferencia de protección entre el Grupo I y II estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Resultados similares obtuvieron Heath y Lightowlers (2001), en la provincia de Xinjiang, China; donde las absorbancias de los corderos control siempre se mantuvieron por debajo de la inmunidad alcanzada por los corderos vacunados durante el tiempo de la investigación.

De este modo se puede indicar que con dos vacunaciones, con un mes de intervalo, es posible otorgar a los corderos inmunidad suficiente para protegerlos contra la infección del metacéstodo del *Echinococcus granulosus* por lo menos durante un año, haciéndose necesario un nuevo refuerzo a los 12 meses después de la primera vacunación, ya que la inmunidad disminuye en el tiempo, lo que no asegura protección en un período de tiempo mayor. Esto coincide con los estudios realizados por Heath y Lightowlers (2001) quienes determinaron que la inmunidad con 2 vacunaciones se mantiene por 12 meses, y puede otorgar cerca de un 85% de protección contra la infección. Al administrar una tercera dosis 6 a 12 meses después de la segunda, se produce una respuesta más alta que la generada con 2 dosis, pudiendo alcanzar cerca de un 100 por ciento de protección, que puede mantenerse hasta 3 o 4 años. Sin embargo, se considera que revacunaciones anuales son más convenientes para evitar la disminución de los anticuerpos protectores. Zhang *et al.* (2003), también indican que con dos dosis de vacuna Eg 95 se logra una inmunidad por 12 meses, y recomienda una revacunación anual para el ganado reproductor.

3.2. Quistes hidatídicos hallados en la necropsia parasitaria.

Los ovinos fueron sacrificados después de 13 meses desde la infección con *Echinococcus granulosus*, similar a lo realizado por Jensen (2001) en la provincia de

Chubut, Argentina, quien sacrificó los corderos en estudio después de 14 meses de efectuada la infección de los animales.

Las vísceras fueron examinadas detalladamente y los hallazgos de necropsia fueron confirmados por histopatología (Figura 2), tal como lo indica Lightowlers y col. (1999) en los ensayos en Australia.

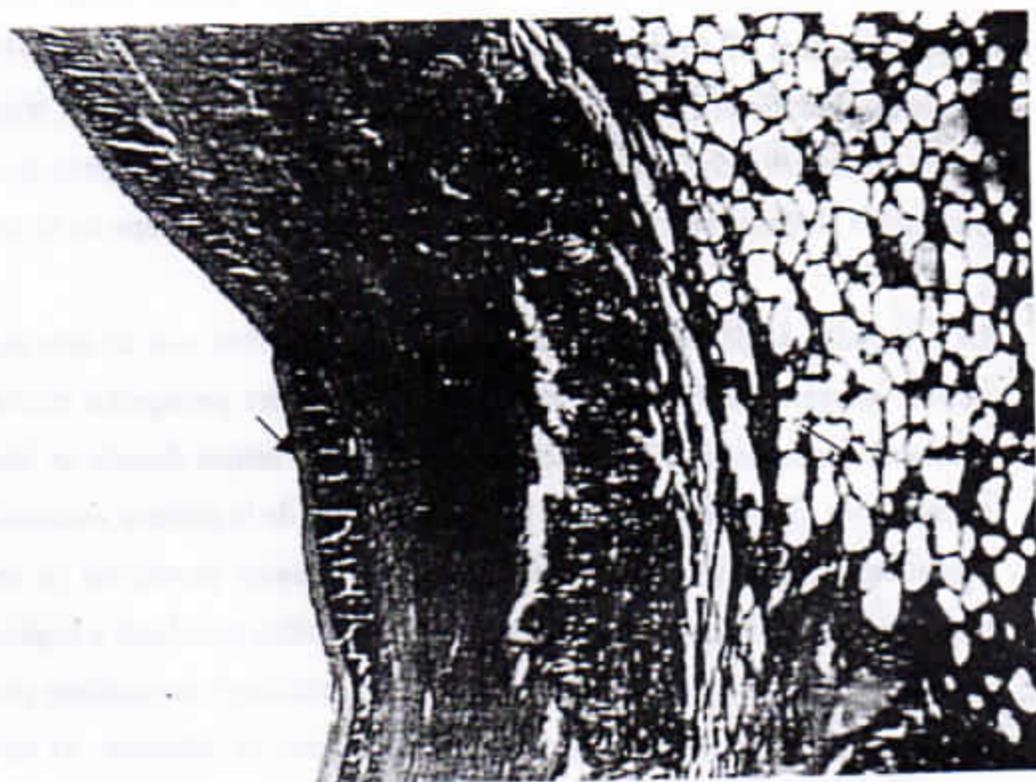


FIGURA 2. Corte histológico de quiste hidatídico ubicado en el pulmón de un ovino del grupo control. Aumento 4X en microscopio óptico. Tinción hematoxilina eosina. De izquierda a derecha se indica: membrana germinativa, membrana laminar, células inflamatorias, alvéolos pulmonares.

El número de quistes obtenidos en los corderos del grupo control es expuesto en la Tabla 4.

TABLA 4. NÚMERO DE QUISTES HIDATÍDICOS ENCONTRADOS EN LA NECROPSIA PARASITARIA, SEGÚN ÓRGANO AFECTADO, EN LOS CORDEROS DEL GRUPO CONTROL.

Cordero N°	Quiestes hidatídicos				
	higado	pulmón	bazo	riñones	corazón
198	0	15	0	0	0
180	4	6	0	0	0
187	52	113	0	0	0
185	5	4	0	0	0
176	15	24	0	1	0
200	0	2	0	0	0
192	6	3	0	0	0
197	3	0	0	0	0
195	13	16	0	1	0
179	3	5	0	0	0
total	101 ^a	188 ^b	0 ^c	2 ^c	0 ^c

N° : Número

* Letras de superíndice distintas indican diferencias significativas en la columna ($p < 0,05$).

En la tabla anterior, se aprecia que el órgano principalmente afectado con el metacéstodo fue el pulmón con una presencia de 188 quistes hidatídicos, luego el hígado con 101 quistes y los riñones con 2. La diferencia que se presenta en el número de quistes entre hígado y pulmón son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El 100% de los corderos del grupo control (10/10) desarrolló el estado larvario del *Echinococcus granulosus*, en alguno de los órganos examinados. En total se detectaron 291 quistes hidatídicos en la necropsia parasitaria de los 10 corderos (Figura 3). La presencia de dichos quistes confirma la no protección de estos animales contra la infección con huevos de *E. granulosus*. Los resultados coinciden con los obtenidos por Jensen (2001), donde en 10 animales controles el 100% presentó quistes hidatídicos, con un total de 232 quistes.

Otros autores como Barriga (1996), Cordero *et al.* (1999) y Salazar (2002) también indican al pulmón e hígado como los órganos principalmente afectados con el estado larvario del *Echinococcus granulosus*, Apablaza *et al.* (1992) indican que en el hombre el quiste hidatídico puede afectar a varios órganos, pero su mayor frecuencia se presenta en el hígado y pulmón, totalizando entre ambos un 85% de las presentaciones.

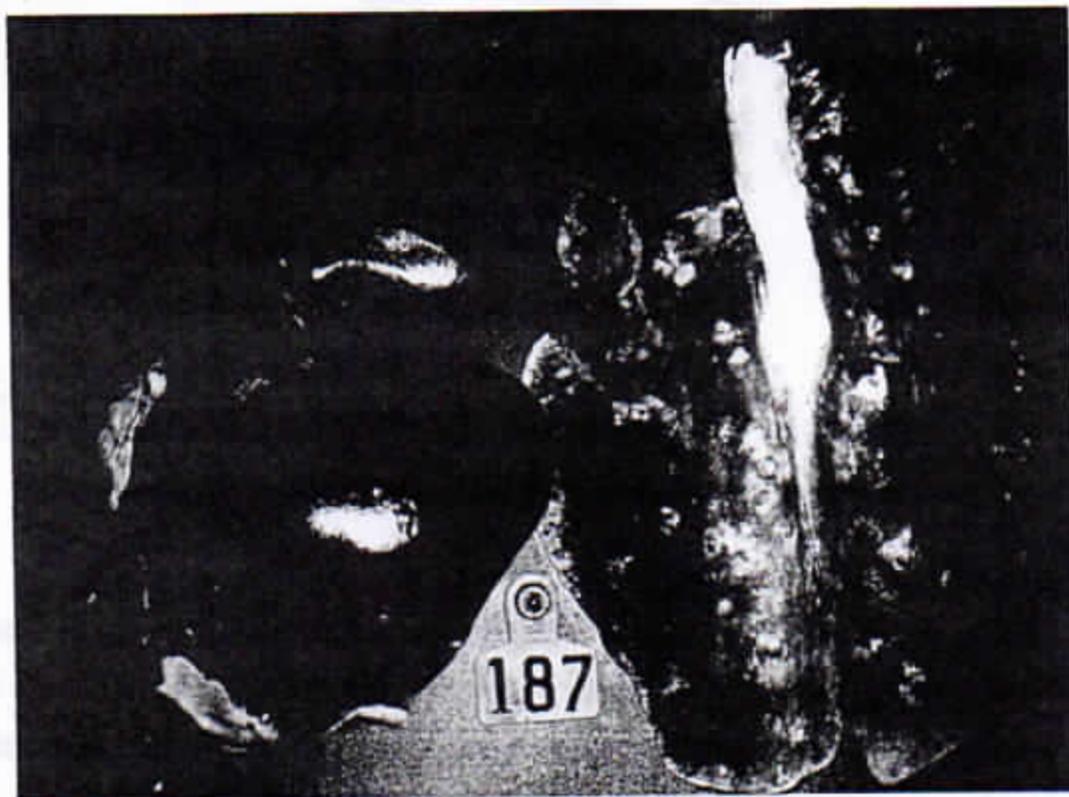


FIGURA 3. Hígado y pulmón con quistes hidatídicos, obtenidos en la necropsia de los corderos. Grupo control.

Los resultados obtenidos en la necropsia de los corderos inmunizados se pueden observar en la Tabla 5.

TABLA 5. NÚMERO DE QUISTES HIDATÍDICOS ENCONTRADOS EN LA NECROPSIA SEGÚN ÓRGANO AFECTADO EN LOS CORDEROS DEL GRUPO VACUNADO.

Cordero N°	Quistes hidatídicos				
	hígado	pulmón	bazo	riñones	corazón
190	0	0	0	0	0
186	0	0	0	0	0
191	0	0	0	0	0
184	0	0	0	0	0
178	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0	0
0-7	0	0	0	0	0
199	0	0	0	0	0
0-2	0	0	0	0	0
0-5	0	0	0	0	0
177	1	0	0	0	0
182	2	0	0	0	0
total	3 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

N° : Número

* Letras de superíndice distintas indican diferencias significativas en la columna ($p < 0,05$).

Del total de 12 corderos vacunados sólo 2 presentaron quistes hidatídicos (16,6%) en la necropsia parasitaria, con un total de 3 quistes, los que se encontraron solamente en el hígado. Esta presentación de quistes en el hígado de los dos corderos, no es estadísticamente significativa respecto a los demás órganos ($p > 0,05$).

De acuerdo a estos resultados se puede afirmar que a los ovinos que recibieron dos dosis de la vacuna Eg 95 se les confirió una protección del 83.3 % contra el desarrollo del metacéstodo del *Echinococcus granulosus* (Figura 4).

Jensen (2001) en el ensayo realizado en Chubut, Argentina, en el año 1995 obtuvo en el grupo vacunado un ovino (1/7) que presentó un quiste hidatídico de 2 mm, con una protección resultante del 99,4%. Heath y Lightowlers (2001), indican que en la provincia de Xinjiang, China, con dos vacunaciones se confirió una protección confirmada por necropsia, de un 85%. Lightowlers et al. (1999) informan los resultados obtenidos en tres

ensayos en Australia, donde obtuvieron protección del grupo vacunado de 80% (4/5), 96% y 99%. También hace referencia a la protección entre 96 y 97% alcanzada en Nueva Zelanda.



FIGURA 4. Hígado y pulmón sin quistes, obtenidos en la necropsia de los corderos.
Grupo vacunado.

Luego de un desarrollo de 13 meses, los quistes hidatídicos encontrados en la necropsia parasitaria fueron medidos. Los resultados de su diámetro se exponen en la Tabla 6.

TABLA 6. TAMAÑO PROMEDIO EN MILÍMETROS DE LOS QUISTES HIDATÍDICOS, GRUPO CONTROL.

Cordero N°	hígado	pulmón	riñón
198	4	5	--
180	4	6	--
187	4	4,6	--
185	--	6,25	--
176	4,7	5,2	4
200	--	9	--
192	6	7	--
197	6,5	--	--
195	4,8	4,6	7
179	5,6	6,6	--
promedio	4,95 ^a	6,03 ^a	5,5 ^a

N° : Número

-- : No presentó quistes en ese órgano.

** Letras de superíndice distintas indican diferencias significativas en la columna ($p < 0,05$).

De acuerdo al tamaño de los quistes el menor desarrollo se presentó en el hígado, donde tuvieron un tamaño promedio de 4,95 milímetros, posiblemente debido al parénquima denso que éste presenta, que ofrece resistencia al crecimiento e infiltración del quiste en el tejido.

El segundo tamaño promedio de 5,5 mm se presentó en el riñón, a pesar de que el parénquima renal es similar al del hígado, esto fue posible debido a que los quistes renales se encontraron en la superficie y no dentro del parénquima; el metacéstodo se anidó en la corteza renal y su desarrollo fue hacia la superficie, donde había menos resistencia, siendo retenido por la cápsula renal.

El mayor desarrollo se registró en los quistes hidatídicos ubicados en los pulmones, con un tamaño promedio de 6,03 milímetros de diámetro, lo que se puede explicar debido a que el parénquima esponjoso de este órgano no ofrece resistencia al avance del metacéstodo, pudiendo este último desarrollarse sin mayores inconvenientes dentro del parénquima pulmonar.

Los diferentes tamaños promedios encontrados en los órganos del grupo control no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

En el caso del grupo vacunado, el tamaño de los quistes encontrados se puede observar en la Tabla 7.

TABLA 7. TAMAÑO PROMEDIO EN MILÍMETROS DE LOS QUISTES HIDATÍDICOS, GRUPO VACUNADO.

Cordero N°	hígado
177	5
182	4
promedio	4,5

N° : Número

Los corderos vacunados solamente presentaron quistes en el hígado y su desarrollo promedio alcanzó un tamaño de 4,5 milímetros, similar al alcanzado en el grupo control.

Los quistes al ser de pequeño tamaño no produjeron grandes cambios patológicos en el tejido, tal como lo indica Anwar *et al.* (1999) en su trabajo con ovinos naturalmente infectados, donde los quistes de pequeño diámetro (1-2 milímetros) demostraron cambios patológicos solamente cerca de la pared del quiste con hepatocitos deformes debido al contenido citoplasmático reducido, similar a lo observado en el ensayo.

Borchert (1981), indica que la implantación de las oncoforas para desarrollarse en los órganos, es diferente en los distintos hospedadores y que no depende tanto de la amplitud de los capilares sino de la inmunidad que presenta cada animal, lo que varía entre especies, edad y constitución del hospedador.

3.3. Ausencia de quistes hidatídicos y protección inmunológica.

Mediante el análisis de necropsia se determinó en los ovinos inmunizados, una protección frente al desarrollo del estado larvario del *Echinococcus granulosus* de un 83,3% (2/12). Sólo dos de estos ovinos presentaron quistes hidatídicos y el órgano afectado fue el hígado, la absorbancia de estos ovinos al momento del desafío con huevos del parásito fue el expuesto en la Tabla 8.

TABLA 8. ABSORBANCIA DE SUEROS OVINOS VACUNADOS, AL MOMENTO DEL DESAFÍO CON HUEVOS DE *Echinococcus granulosus*, Y QUE PRESENTARON QUISTES HIDATÍDICOS EN LA NECROPSIA PARASITARIA.

Muestra	Media D.O. 1/3200
Positivo	1,739
Negativo	0,187666667
Estándar	0,984
177	1,0805
182	0,949

D.O. : Absorbancia

Las absorbancias de estos ovinos no alcanzaron los registrados por el control positivo (que indica 100% de protección), sino que obtuvieron niveles cercanos al control estándar (80% de protección), lo que permitió que el metacéstodo del *Echinococcus granulosus* tuviera posibilidades de asentarse y desarrollarse en el órgano afectado.

IV CONCLUSIONES

- La inmunidad obtenida en el grupo experimental, otorgó una protección de 83,3% contra el desarrollo del metacéstodo del *Echinococcus granulosus*.
- El 100% de los corderos del grupo control (10/10) desarrolló el estado larvario del *Echinococcus granulosus*, con un total 291 quistes hidatídicos, cuyo tamaño promedio varió entre 4,95 y 6,03 mm, siendo el pulmón el principal órgano afectado.
- De los 12 corderos vacunados sólo 2 (16,6%) presentaron un total de 3 quistes hidatídicos, de un tamaño promedio de 4,5 mm ubicados en el hígado.

2002/2003
000

V RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA VACUNA Eg 95 CONTRA HIDATIDOSIS, EN OVINOS.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta protectora inducida por la vacuna Eg 95 contra la hidatidosis animal, en corderos de tres meses de edad, infectados experimentalmente con huevos de *Echinococcus granulosus*.

Se utilizaron 10 corderos controles, no vacunados y 12 corderos, grupo experimental vacunado. La vacunación se realizó con 2 ml de la vacuna Eg 95, vía subcutánea, en 2 dosis con un intervalo de 30 días. La infección experimental de los corderos se realizó a los 4 meses posteriores a la primera vacunación. Se obtuvo suero de los corderos para ser analizados mediante la técnica de ELISA con el fin de determinar los niveles de anticuerpos anti Eg 95. Todos los corderos fueron sacrificados después de 13 meses de la infección experimental.

El 100% de los corderos del grupo control (10/10) desarrolló el estado larvario del *Echinococcus granulosus*, con un total de 291 quistes hidatídicos, el órgano más afectado fue el pulmón.

De los 12 corderos vacunados sólo 2 (16,6%) presentaron un total de 3 quistes hidatídicos, de un tamaño promedio de 4,5 mm ubicados en el hígado. Se logró una protección del 83,3 % contra el desarrollo del metacéstodo del *Echinococcus granulosus* en los corderos vacunados.

Palabras clave: Vacuna Eg 95, *Echinococcus*, hidatidosis.

VI SUMMARY

EVALUATION OF VACCINE Eg 95 AGAINST HYDATIDOSIS, IN OVINES.

The objective of the present study was to evaluate the protective response induced by the Eg 95 vaccine against hydatidosis, in lambs of three months of age, experimentally infected with eggs of *Echinococcus granulosus*.

10 lambs, used as controls, were not vaccinated, and 12 lambs, were the vaccinated experimental group. The vaccination was made subcutaneously with 2 milliliters of the Eg 95 vaccine, in 2 doses with an interval of 30 days. The experimental infection of the lambs was made 4 months after the first vaccination. Serum of the lambs was obtained and analyzed by means of the ELISA technique with the purpose of determining the levels of anti Eg 95 antibodies. All the lambs were sacrificed 13 months after the experimental infection.

100% of the lambs of the control group (10/10) developed the larval state of *Echinococcus granulosus*, with a total of 291 hydatid cysts. The most affected organ was the lung.

Of the 12 vaccinated lambs only 2 (16,6%) displayed a total of 3 hydatid cysts, of an average size of 4,5 mm located in the liver. An 83,3 % effectiveness against the development of metacestodes of the *Echinococcus granulosus* was obtained in the vaccinated lambs.

Key words: Vaccine Eg 95, *Echinococcus*, hydatidosis.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. Acha, P., B. Szyfres. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. (2ª ed.) OPS/OMS. Washington DC, USA.
2. Acha, P., B. Szyfres. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. (3ª ed.) OPS/OMS. Washington DC, USA.
3. Aliaga, F., C. Oberg, 2000. Epidemiología de la hidatidosis humana en la IX Región de la Araucanía, Chile: 1991-1998. Bol. Chil. Parasitol. 55 (3-4) : 54-58.
4. Alcaíno, H., T. Gorman, 1999. Parásitos de los animales domésticos en Chile. Parasitol. día. [en línea]. 23 (1-2) : 33-41
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-07201999000100006&lng=es&nrm=iso [consulta: 21 Julio 2003]
5. Apt, W., C. Pérez, E. Galdamez, S. Campano, F. Vega, D. Vargas, J. Rodríguez, C. Retamal, P. Cortés, I. Zulantay y P de Rycke. 2000. Equinococosis/hidatidosis en la VII Región de Chile: diagnóstico e intervención educativa. Revista panamericana de salud pública.7 (1): 8-16, (CAB Abstr. 2000/08-2001/10)
6. Apablaza, S., R. Burmeister, C. Benavides, H. Gacitua y F. Nara. 1992. Tratamiento quirúrgico del quiste hidatídico hepático. Rev. Chil. Cirugía. 44 (4) : 424-427.
7. Anwar Z, A. Tanveer and B. Shahid. 1999. Echinococcus granulosus: histopathology of naturally infected sheep liver. Punjab Univ. J. Zool. 14: 105-111 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).

8. Barriga, O., 1996. Veterinary Parasitology. Department of Veterinary Preventive Medicine. The Ohio State University. USA.
9. Benito, A., D. Carmena, P. Spinelli, I. Postigo, J. Martínez, J. Estibalez, F. Martín de la Cuesta and J. Guisantes. 2001. The serological diagnosis of canine echinococcosis by an enzyme immunoassay useful for epidemiological surveys. *Rev. Iber. Parasitol.* 61 (1-2) : 17-23 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
10. Borchert, A. 1981. *Parasitología Veterinaria*. Acribia. Zaragoza, España.
11. Cabrera, P., 2002. Hidatidosis. Dpto. Parasitología-Enf. Parasitarias, Fac. Veterinaria, U de la R.R.O.U, Uruguay . [en línea]. http://www1.inta.gov.ar/producto/helminto/rtandil_01.htm (consulta: 16 de julio 2003).
12. Canales, M., M. Torres, T. Sanchez, R. Nuñez, D. Ivanovic, A. Díaz y H. Muñoz. 1994. Elisa para el diagnóstico de hidatidosis humana. *Rev. Chile. Infect.* 11 (4) : 243-247.
13. Conchedda, M., A. Ecça, F. Gabriele, G. Bortoletti, C. Palmas, P. Craig and Z. Pawlowski. 2002. Options for control of Echinococcosis: the Sardinian example. pp 343-354. In: Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis: an emergent and global problem. Poznan, Poland, 10-13 September 2000 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
14. Cordero del Campillo, M, F. Rojo, A. Martínez, M. Sánchez, S. Hernández, I. Navarrete, P. Díez, H. Quiroz y M. Carvalho, 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.

15. Child V., R Fasce, D. Gallegos, B. Medina, A. Olea, E Ortiz, M Rojas, V. Sotomayor y C. Vallebuona, 2003. Situación de enfermedades de notificación obligatoria [en línea]. <http://epi.minsal.cl/evigant/Numero17/evigia/html/notific/antrx/antrxl.htm> (consulta: 15 julio 2003).
16. Chuquisana, J., A. Chávez y E. Casas. 2000. Determinación de *Echinococcus granulosus* en perros del cono Norte de Lima. Rev. Inv. Vet. Perú. 11 (2) :126-131.
17. Ding, J.B., R.Y. Lin and H. Wen. 2003. Cloning sequencing of Eg95 antigen gene and construction of pcDNA3-Eg95. Chin. J. Zoonoses. 19 (1) : 42-44 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
18. EL CONTROL DE LA HIDATIDOSIS. 1999. Bol. chil. Parasitol. 54 (3-4): 49-49. [en línea]. <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-94021999000300001&lng=es&nrm=iso>. [consulta: 12 Septiembre 2003].
19. González, J., G. González, A. Sbaffo, A. Bessone, M. Chassagnade. L. Ugnia, A. Weyers, N. Espósito, G. Bernardes, A. Alcoba, C. Guendulain y P. Flores. 1998. Equinococosis canina en un sector del Departamento de Río Cuarto, Provincia de Córdoba, Argentina. Arch. Med. Vet. 30 (2) : 157-163.
20. Heath D., B. Holcman. 1997. Vaccination against *Echinococcus* in perspective, Acta Tropica. 67 : 37-41.
21. Inostroza, J., P. Díaz, R. Gutiérrez, R. Espinoza y M. Henríquez, 1989. Ig-G específica para *E. Granulosus*. Rev. Méd. del sur 14 (2):51-53.
22. Jiao, W., J. Chai, I. Osman, C. Fu and Q. Qu. 1999. Coproantigen detection on dogs infected with *Echinococcus granulosus*. III. A field evaluation of

- coproantigen detection in diagnosis of *E. granulosus* infection in dogs with double antibody sandwich ELISA. *Chin. J. Zoonoses*. 15 (6): 28-29. (CAB Abstr. 2000/08-2001/10).
23. Jiao W., J. Chai and C. Fu. 2003. Field investigation of the control of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by subcutaneously plantation with a sustained slow release preparation of praziquantel. *Chin. J. Zoonoses*. 19 (1) : 102-104 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
24. Karaman, U., M. Atambay, O. Aycan and N. Daldal, 2002. Comparison of human, cow and sheep antigens in the indirect hemagglutination technique. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*. 26 (3) : 251-253 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
25. Kittelberger, R., M. Reichel, J. Jenner, D. Heath, M. Lightowers, P. Moro, M. Ibrahim, P. Craig and J. O'Keefe. 2002. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the detection of serum antibodies in sheep infected with *Echinococcus granulosus*. *Veterinary Parasitol.* 110 (1-2) : 57-76 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
26. Lamberti, R., C. Calvo, A. Pombar, L.Gino, E. Álvarez, C. Aguado and A. Larrieu. 1999. Hydatidosis in the Province of La Pampa, Argentina, 1998. *Bol. Chil. Parasitol.* 54 (3-4) : 110-112.
27. Larrieu, E., C. Mercapide, M. del Carpio, J. C. Salvitti, M. Costa, S. Romeo, G. Cantoni, A. Pérez and A. Thakur. 2000a. Evaluation of the losses produced by hydatidosis and cost/benefit analysis of different strategic interventions of control in the Province of Rio Negro, Argentina. *Bol. Chil. Parasitol.* 55 (1-2) : 8-13.

28. Larrieu, E., M. Costa, G. Cantoni, J. Labanchi, R. Bigatti and A. Pérez. 2000b. Control program of hydatid disease in the province of Rio Negro, Argentina, 1980-1997. *Bol. Chil. Parasitol.* 55 (3-4): 49-53.
29. Lightowlers, M., O. Jensen, E. Fernández, J. Iriarte, D. Woollarda, C. Gaucia, D. Jenkins y D. Heath. 1999. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int. J. Parasitol.* 29 :531-534
30. Lightowlers, M, P. Craig and Z. Pawlowski. 2002. Vaccines for control of cysticercosis and hydatidosis. Pp 381-391. In: Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis: an emergent and global problem. Poznan, Poland, 10-13 September 2000 (CAB Abstracts 2002/08-2003/04).
31. Lloyd, R., 2003 Hidatidosis. Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche. [en línea]. <http://www.apuntesuniversitarios.com/Hidatidosis/hidatido.htm> [consulta: 20 de julio 2003].
32. Muñoz C., M. Parra, L. Rivera, M.A. Orrego y L. Mena. 1999. Hidatidosis en la provincia de Ñuble. Estudio descriptivo sobre egresos hospitalarios entre los años 1993 y 1997. *Rev. Chil. Infect.* 16 (2) :137-146.
33. Neghme, A. 1983. Planes nacionales para el control de la hidatidosis en Chile. *Parasitol. día.* 7 (4) : 9-9.
34. Pinto, P. 1994. Tratamiento médico de la hidatidosis. *Rev. Chil. Cirugia.* 46 (4) : 437-440.

35. Raposo, L., I. Folatre y C. Dib. 1985. Hidatidosis humana en la provincia de Última Esperanza. *Parasitol. al día* 9 (1) : 15-21.
36. Retamal, C., C. Pérez, I. Noemí, X. Aguilera y W. Apt. 1994. Evaluación de las técnicas de doble difusión 5 e inmunoelectroforesis en hidatidosis infantil en la casuística de un decenio. *Rev. Chil. Pediatr.* 65 (5) : 251-254.
37. Rivera, A., G. Villagrán, E. Ojeda y E. Alves. 1998. Avances en el control de la equinococosis/hidatidosis en comunas de la provincia de Palena. *Arch. Med. Vet.* 30 (Número Extraordinario) :31-32.
38. Rubilar, L., L. Zapata, G. Moreno y S. Cerda. 1985. Prevalencia de *Echinococcus granulosus* y de otros céstodos del perro en la comuna del Carmen, Ñuble. *Parasitol. al día* 9 :55-57.
39. Rubilar, L., W. Rosal, G. Reyes, A. Pons y G. Merino. 1998. Equinococosis en perros e hidatidosis ovina en Alto Bío-Bío, VIII Región. Chile. Resúmenes X Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. *Arch. Med. Vet.* 30. (Número extraordinario) : 309-310.
40. Salazar, A. 2002. Evaluación del Programa de control de la Equinococosis canina en Alto Bío Bío, VIII Región. Memoria de Título. Med. Vet. Universidad de Concepción, Fac. Med. Vet. Chillán, Chile.
41. Schenone H., M. Contreras, P. Salinas, L. Sandoval, T. Saavedra y A. Rojas, 1999. Hidatidosis humana en Chile. Seroprevalencia y estimación del número de personas infectadas. *Bol. Chil. Parasitol.* 54 (3-4) : 70-73.
42. Serra I., J. Araneda, C. Araya y V. Serra. 1996. Análisis regional de la hidatidosis humana y animal en Chile, 1989-1993. *Bol. Chil. Parasitol.* 51 : 3-12.

43. Shantz, P. 1973. Guía para el empleo del bromhidrato de arecolina en el diagnóstico de la infección por *Echinococcus granulosus* en el perro. Bol. Chil. Parasitol. 28 : 81-90.
44. Soulsby, E. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. (7ª ed). Interamericana. México D.F, México.
45. Vargas, D., G. Sabbe, C. Pérez, E. Galdamez, W. Apt y P. de Rycke. 1994. DOT-ELISA en el diagnóstico de la hidatidosis humana. Parasitol. al Día. 18 : 88-93.
46. Zamorano, C., M. Contreras, P. Salinas, C. Silva, V. Catalán y M. Bahamondes. 2001. Estudio seroepidemiológico de la hidatidosis humana en la comuna de San Juan de la Costa, Osorno, X Región, Chile. Bol. Chil. Parasitol. 56 (3-4) : 100-101.
47. Zhang, W., J. Li and D. McManus. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clin. Microbiol. Rev. 16 : 18-36.
48. Zúñiga, R., C. González, J. Naranjo y L. Espejo. , 2000. Informe de decomisos registrados en mataderos año 2000. : 16- 19. Vigilancia Epidemiológica, Boletín N° 37 Servicio Agrícola y Ganadero. Santiago, Chile.

VIII ANEXO

TABLA I A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 0.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,382		1,702
Negativo	0,025		0,1
Etándar	1,0865		0,953
176	0,049	177	0,143
179	0,0335	178	0,077
180	0,058	182	0,137
185	0,036	183	0,105
187	0,0545	184	0,137
192	0,06	186	0,06
195	0,056	190	0,116
197	0,061	191	0,079
198	0,042	199	0,078
200	0,0205	2	0
		5	0
		7	0,07
promedio	0,04705		0,0835

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Se usó el suero estándar como número de corte para determinar si una muestra tiene anticuerpos protectivos. Sobre el estándar es positivo, bajo el estándar son negativos.

Nº de corte GI: 1,0865

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0,953%

positivos GII: 0%

negativos GII: 100%

TABLA 2 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 42 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media O.D. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media O.D. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,04		1,695
Negativo	0,018		0,10775
Etándar	0,675		0,932
176	0,0175	177	1,731
179	0,138	178	2,0675
180	0,1175	182	1,9595
185	0,0635	183	0,5215
187	0,018	184	0,9225
192	0,0975	186	1,752
195	0,028	190	1,751
197	0,0295	191	1,688
198	0,127	199	2,0005
200	0,082	2	1,1575
		5	1,9105
		7	1,716
promedio	0,07185		1,598125

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0.675

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0.932

positivos GII: 83,3%

negativos GII: 16,7%

TABLA 3 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 150 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,2995		1,53
Negativo	0,042		0,319
Etándar	0,6405		0,967
176	0,026	177	1,1915
179	0,0625	178	1,2365
180	0,0325	182	1,356
185	0,0635	183	0,293
187	0,053	186	0,533
192	0,0285	184	1,693
195	0,0385	190	1,003
197	0,0405	191	1,603
198	0,0555	199	1,1975
200	0,026	2	0,607
		5	0,8865
		7	0,565
promedio	0,04265		1,01375

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0.6405

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0.967

positivos GII: 58,3%

negativos GII: 41,7%

TABLA 4 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 180 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,665		1,687
Negativo	0,0445		0,373
Etándar	0,7785		1,085
176	0,016	177	1,0805
179	0,044	178	1,7235
180	0,074	182	0,949
185	0,033	183	0,248
187	0,022	184	0,395
192	0,0545	186	1,141
195	0,0815	190	0,805
197	0,031	191	1,4135
198	0,0275	199	1,2615
200	0,0475	2	1,144
		5	1,579
promedio	0,0431		1,067272727

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0.7785

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 1.085

positivos GII: 63,6%

negativos GII: 36,4%

TABLA 5 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 270 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,8325		1,6995
Negativo	0,039		0,0545
Etándar	0,6245		0,5205
176	0,048	177	0,3015
179	0,02	178	1,5495
180	0	186	0,7785
185	0,0855	182	0,6425
187	0,0445	183	0,0455
192	0	184	0,2905
195	0	190	0,3585
197	0,0685	191	0,8045
198	0,024	199	1,5385
200	0	2	0,9525
		5	1,8115
		7	0,8085
promedio	0,02905		0,8235

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0.6245

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0.5205

positivos GII: 66,7%

negativos GII: 33,3%

TABLA 6 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 330 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,2235		1,1855
Negativo	0		0
Etándar	0,632		0,541
176	0,24	177	0,5915
179	0,032	178	0,607
180	0,0465	182	0,5815
185	0,0295	183	0,537
187	0	184	0,3055
192	0	186	0,3935
195	0	190	0,549
197	0	191	0,5005
198	0	199	0,449
200	0	2	0,7475
		5	1,2515
		7	0,811
promedio	0,0348		0,610375

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0,632

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0.541

positivos GII: 58,3%

negativos GII: 41,7%

TABLA 7 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 360 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,6015		1,765
Negativo	0,1485		0,095
Etándar	0,77		0,9335
180	0,175	177	0,691
185	0,338	178	1,638
187	0,17	182	0,968
192	0,1355	184	0,293
195	0,1665	186	1,098
197	0,124	190	0,8075
198	0,133	191	1,542
200	0,0955	199	1,024
		2	0,8785
		5	0,941
		7	0,75
promedio	0,1671875		0,966454545

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0.77

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0,9335

positivos GII: 54,5%

negativos GII: 45,5%

TABLA 8 A. ABSORBANCIA (D.O.) DE LOS SUEROS DEL GRUPO CONTROL Y VACUNADO, EN EL DÍA 390 POSTERIOR A LA PRIMERA VACUNACIÓN.

Muestra	Media D.O. 1/3200 control (GI)	Muestra	Media D.O. 1/3200 vacunado (GII)
Positivo	1,212		1,6645
Negativo	0,043		0,0885
Etándar	0,9655		0,941
176	0,015	177	0,789
179	0,037	178	1,783
180	0,0305	182	0,842
185	0,1175	183	0,012
187	0,0725	184	0,3585
192	0,0595	186	1,0215
195	0,039	190	0,549
197	0,106	191	1,726
198	0,0385	199	1,09
200	0,0315		
promedio	0,0547		0,90788889

GI: grupo I, control

GII: grupo II, experimental

Nº de corte GI: 0,9655

positivos GI: 0%

negativos GI: 100%

Nº de corte GII: 0,941

positivos GII: 44,4%

negativos GII: 55,5%