

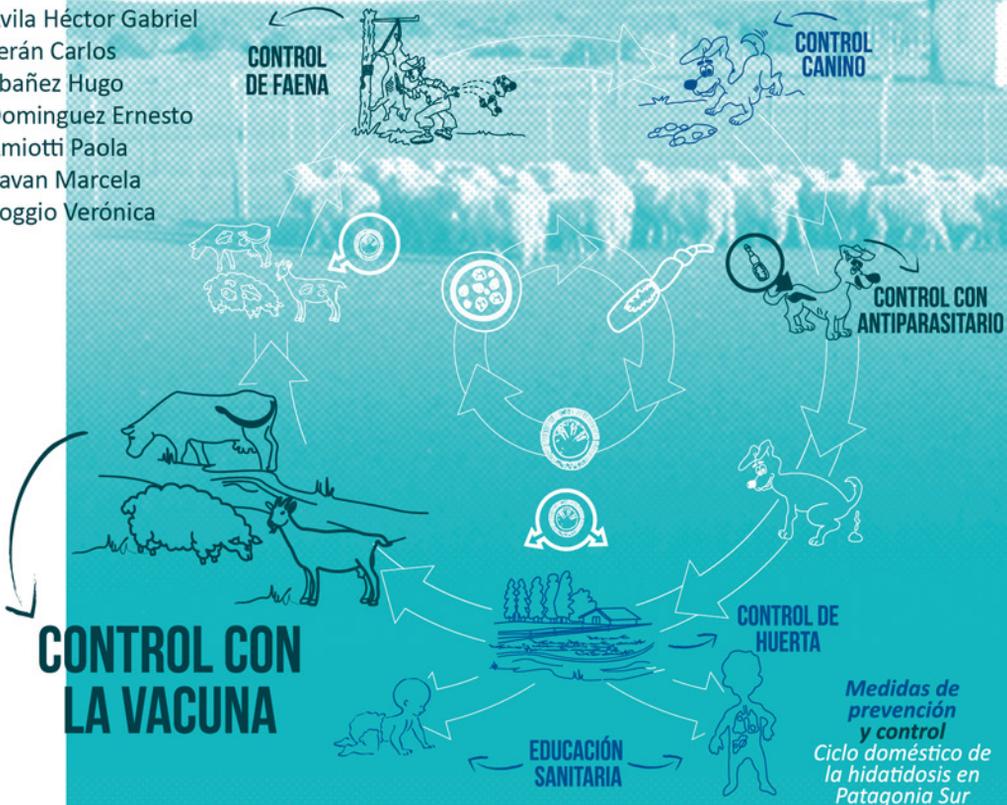
Editor: **Oscar JENSEN**
Médico Veterinario. Chubut.-

HIDATIDOSIS

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95 EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

*Los ensayos en Argentina.
Período 1995 - 2016*

Jensen Oscar
Iriarte Jorge
Fernández Eduardo
Mossello Mafalda
Martinez Gustavo
Gertiser María Laura
Avila Héctor Gabriel
Terán Carlos
Ybañez Hugo
Dominguez Ernesto
Amiotti Paola
Pavan Marcela
Poggio Verónica



HIDATIDOSIS

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95

EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

Los ensayos en Argentina.

Período 1995 - 2016

Editor: Oscar JENSEN

Médico Veterinario, Centro de Investigación en Zoonosis
Chacra 18, C.P. (9020), Sarmiento, Chubut, Argentina.

e-mail: hidatidosis@coopsar.com.ar

Tel - Fax +54 297 4896413

Todos los derechos reservados. Se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, CON el permiso por escrito previo del autor, y los titulares de los derechos.

Nov. 2016.-

HIDATIDOSIS

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95

EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

*Los ensayos en Argentina.
Período 1995 - 2016*

Jensen Oscar¹

Iriarte Jorge²

Fernández Eduardo³

Mossello Mafalda³

Martinez Gustavo³

Gertiser María Laura¹

Avila Héctor Gabriel¹

Terán Carlos¹

Ybañez Hugo¹

Dominguez Ernesto⁴

Amiotti Paola⁵

Pavan Marcela⁵

Poggio Verónica⁶

1- Centro de Investigación en Zoonosis. Ministerio de Salud y Ministerio de la Producción. Sarmiento, Chubut, Argentina. E-mail: hidatidosis@coopsar.com.ar

2- Establecimiento "La Isla". Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

3- Departamento Zoonosis. Ministerio de Salud, Chubut, Argentina.

4- Dirección de Ganadería, Ministerio de la Producción, Chubut, Argentina.

5- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA, Argentina.

6- Centro de Virología Animal - Instituto de Ciencia y Tecnología "Cesar Milstein - CONICET, Argentina.

1. RESUMEN

La Echinococcosis Quística (EQ) es una zoonosis controlable. Con la educación sanitaria de la población expuesta al riesgo de enfermar, el control de la faena y la desparasitación periódica de los perros domésticos, se logró erradicar la hida-tidosis en ámbitos insulares, como Islandia, Tasmania y Nueva Zelandia, pero en áreas continentales de Sudamérica, no se pudieron repetir estos logros. A mediados de la segunda década del siglo XXI, sigue siendo un serio problema socioeconómico, que afecta la salud de los habitantes de zonas endémicas y deteriora la producción ganadera. La disponibilidad de la vacuna EG95 a escala industrial, abre una nueva perspectiva que, sumada al resto de las medidas de control disponibles, podrían acelerar los tiempos para evitar que se siga enfermando el ganado y los seres humanos.

En Argentina entre los años 1995 y 2016, se realizaron ensayos en estudios experimentales multicéntricos, controlados y aleatorios, bajo un mismo protocolo. Con la vacuna experimental 6 ensayos en ovinos y 1 en caprino. Con la vacuna industrial 4 ensayos en ovinos y 1 en llamas. Los animales de los ensayos fueron rumiantes menores de menos de 25 semanas, no expuestos a la infección por *E. granulosus*. La vacuna fue aplicada en forma subcutánea, a la dosis de 50 μ g de la proteína EG95 y 1 mg de adyuvante Quil A o Montanide ISA70 en un volumen de 2 ml. Sus resultados fueron evaluados por seguimiento serológico y/o por desafío con huevos de *E. granulosus* y necropsia.

Los rumiantes menores que recibieron 2 dosis con 1 mes de intervalo y fueron desafiados entre los 6 meses y 12 meses posteriores fueron protegidos entre el 82 y 97%. En ensayos realizados con una dosis y el desafío realizado a los 5 y 12 meses se logró una protección del 82 % y 85 %. En un ensayo realizado con 3 dosis se logró una protección del 100%. La inmunidad a largo plazo medida luego de 3 y 4 dosis y el desafío a 33 meses y 1 mes, logró una protección del 85% y 95%. La protección inducida por la vacuna industrial y la vacuna experimental fueron equivalentes.

2. INTRODUCCIÓN

En 1796, Edward Jenner (1749–1823), investigador, médico rural y poeta inglés, realizó la primera inoculación contra la viruela, enfermedad que causaba estragos en el mundo. Un niño de ocho años de edad, fue el primer inoculado con secreción recogida de una pústula vacuna (viruela de vacas) en la mano de una lechera que se había infectado durante un ordeño. Semanas después inoculó nuevamente al pequeño, con pus procedente de una persona enferma de viruela. El niño quedó indemne, con lo cual se demostró la acción profiláctica de la inoculación contra la viruela humana.

De las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas, la vacunación es la más útil. Las vacunas constituyen un medio eficaz y rentable para prevenir y controlar, o incluso erradicar, enfermedades infecciosas. Si previenen infecciones zoonóticas, las vacunas veterinarias pueden proteger no sólo la salud de los animales, sino también la del hombre. La disponibilidad de una vacuna contra la EQ aplicada al ganado, permitirá la reducción de la oferta de QH disponibles para los hospedadores definitivos, lo que implica reducir la biomasa parasitaria disponible para los hospedadores intermediarios.

E. granulosus infecta sus hospedadores de formas diversas y con algunas variaciones en su ciclo vital. La variabilidad de hospedadores intermediarios y de órganos afectados puede influir en

la respuesta inmunitaria del hospedador al parásito. Las formas parasitarias que pueden desencadenar esta respuesta inmunitaria en el hospedador intermediario son la oncósfera invasora, el quiste hidatídico maduro y los protoescólices liberados después de la rotura del quiste hidatídico. (Lightowers MW 1994).

2.1.- LOS PRIMEROS ENSAYOS. LA VACUNA CON LÍQUIDO HIDATÍDICO Y/O PROTOESCÓLICES

En 1927, Félix Agustin Dévé (1872-1951), médico e hidatidólogo francés, publicó trabajos, describió sus intentos de producir inmunidad artificial experimental, contra *E. granulosus* en conejos. Los conejos fueron inmunizados con la inyección de líquido hidatídico y arena hidatídica de ovejas. Tres meses después del desafío, se encontraron quistes a la observación microscópica. (Dévé FA 1927).

En la década del 30, Turner, Dennis y Berberian del Departamento de Medicina y Parasitología, de la Universidad Americana de Beirut, estudiaron la posibilidad de producir inmunidad artificial contra *E. granulosus*, en hospedadores intermediarios y definitivos. En 1937 publicaron sobre una vacuna experimental en ovejas. Prepararon el antígeno con protoescólices y membranas de quistes del pulmón ovino, llevado a fino polvo por desecación. Inician el trabajo con 70 ovejas preñadas. Sus corderos fueron inmunizados con 1, 2, 3 y 4 dosis de vacuna aplicada en forma intramuscular. Trabajaron con 115 corderos, los vacunados y controles son desafiados vía oral con 500 y 1000 oncósferas, obtenidas de materia fecal canina. Entre 11 y 12 meses post-vacunación se realizaron las necropsias, y se observaron hígado, pulmón, bazo y riñones. Los resultados obtenidos muestran que el procedimiento de inmunización no previno la infección, pero si redujo el número de quistes y su tamaño, en comparación con los controles. En los quistes de los animales

inmunizados se observó paredes engrosadas, calcificación temprana, degeneración de membrana y protoescólices degenerados. (Turner EL 1937).

Ni Dévé en Francia en 1927, ni Tuner y col en Beirut en la década del 30, ni Velarde Perez Fontana en Uruguay en la década del 40, ni Dada y Belino en Nigeria y ni Adrián Bitsch en Argentina en la década del 80, lograron obtener resultados satisfactorios inyectando antígenos derivados de líquido hidatídico y/o protoescólices.

2.2.- LA VACUNA CON ONCÓSFERAS Y/O HUEVOS

Michael Gemmell del Hydatid Research Unit de New Zeland, realizó investigaciones en inmunidad relacionadas con *E. granulosus* en tres estudios durante 1964 y 1965. Vacunó en forma intramuscular corderos con huevos y oncósferas, como antígeno bruto, obtenidos de *E. granulosus*, de *Taenia hydatigena* y *T. ovis* de ovinos y de *T. pisiformis* de conejos. Los corderos fueron desafiados posteriormente con los huevos de *E. granulosus*. Se establecieron quistes hidatídicos en los animales vacunados con ténidos. Los huevos u oncósferas de *E. granulosus* fueron capaces de inducir una respuesta inmune fuerte. (Gemmell MA 1966).

Junto a Soulsby de la Universidad de Pennsylvania (USA) en 1996, realizaron una revisión sobre el desarrollo de la inmunidad adquirida y el progreso en la inmunización activa. Definieron que los próximos estudios deberían conducir a una mejor comprensión de la reacción antígeno-anticuerpo y sus consecuencias sobre la relación huésped-parásito. Platearon que las investigaciones dirigidas hacia el aislamiento y la caracterización de los antígenos funcionales podrían conducir al desarrollo de vacunas, para uso en programas de salud pública. (Gemmell MA 1968).

En 1970, David Heath presentó su tesis doctoral en la Universidad Nacional de Australia sobre la biología del desarrollo de las formas larvales de ténidos que causan EQ y cisticercosis en los mamíferos.

En la década del 80, Heath y Osborn, demostraron en corderos de raza Romney Marsh de Nueva Zelandia, inmunizados con homogenato de oncósferas, un alto nivel de resistencia a la infección oral con huevos de *E. granulosus*. El suero de estos animales inhibió el desarrollo de quistes hidatídicos in vitro. Con la vacunación a base de oncósferas lograron obtener niveles altísimos de protección en ovejas contra la infección con huevos. Dos aplicaciones subcutáneas, de oncósferas activadas de *E. granulosus* estimularon la aparición de protección casi completa contra infecciones repetitivas. (Heath DD 1981 y Osborn PJ 1982). Estos resultados dieron origen al desarrollo posterior de una vacuna formulada **con extractos de oncósferas** del parásito.

La limitante principal de la aplicación de las vacunas para controlar la parasitosis producida por *E. granulosus*, reside en el abastecimiento y la disponibilidad del antígeno a gran escala. La fuente más potente del antígeno es la oncósfera. No es práctico, salvo en estudios experimentales, contar con suficiente antígeno preparado desde las mismas. Para desarrollar una vacuna de distribución masiva, es esencial identificar los antígenos protectores específicos en la oncósfera de *E. granulosus*. (Lightowlers MW 1996).

2.3.- LA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA EQ

En 1989, en Nueva Zelandia, se produjo una vacuna a base de antígenos recombinantes, contra la infección por *T. ovis* en ovinos. Fue la primera vacuna recombinante, muy satisfactoria, con eficacia a campo y registrada para la distribución comercial, contra una parasitosis.

Con el avance de la ingeniería genética, el equipo liderado por Lightowlers de la Universidad de Melbourne (Australia) y Heath de la Ag Research (Nueva Zelandia) lograron clonar el antígeno EG95 en un vector plasmídico y expresar la proteína en la bacteria *Escherichia coli*.

En 1993, Heath y Lightowlers presentaron “el desarrollo exitoso de una vacuna recombinante frente a la enfermedad hidatídica” en el 16° Congreso Internacional de Hidatidología que se realizó en Pekín, China, donde informaron a la comunidad científica acerca del desarrollarlo de una vacuna que protegía a los ovinos contra la infección por *E. granulosus*. Dos inmunizaciones de 50 µg de antígeno produjeron una protección del 96% frente al desarrollo de quistes hidatídicos, protegiendo a los diez ovinos vacunados ante el desafío con huevos de *E. granulosus*, comparado con los ocho ovinos controles.

En 1996, Heath y Lawrence publicaron sobre la identificación de la molécula antigénica EG95 en oncósferas maduras. Definieron la secuencia de los polipéptidos de la oncósfera que induce respuesta inmune de anticuerpos, su asociación con la aparición temprana de protección y la lisis de las oncósfera in vitro por la presencia de dichos anticuerpos séricos. Demostraron la relevancia de antígenos nativos de 23, 25, 30, 34 y 40 kDa en la respuesta inmune protectora contra la infección por *E. granulosus*. La confirmación final fue proporcionada por la inmunización de ovinos y su posterior desafío con el parásito. Sólo la fracción de peso molecular en el rango de aproximadamente 23-25 kDa (proteínas EG95), incluyendo los aminoácidos 4 a 77, fue capaz de generar una respuesta inmunológica del tipo IgG que resultó protectora contra la infección por *E. granulosus*. (Heath DD 1996).

En 1996, Heath y Lightowlers describieron el desarrollo de la vacuna recombinante contra EG. El antígeno EG95 es una proteína

recombinante de 16 kDa clonada a partir de ARNm obtenido de huevos del parásito que es expresada como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (EG95-GST) dando como resultado un producto de 40 kDa. La proteína EG95 emulsionada con el adyuvante Quil A, protege frente a la infección por *E. granulosus* al inducir anticuerpos específicos del tipo IgG1 e IgG2 contra oncosferas. A través de este mecanismo inmunológico el parásito es eliminado cuando ocurre la infección, antes de poder establecerse en los tejidos del hospedador. Los ensayos establecieron que la cantidad de antígeno necesario era de 50 µg de proteína EG95 para ovinos y caprinos y mostraron que Quil A fue el adyuvante disponible que promovió el nivel más alto y la mayor persistencia de la protección, con una mínima reacción en el sitio de la inyección a una dosis de 1 mg. Utilizando el doble de la dosis recomendada superó las pruebas sobre posibles signos de reacciones locales, sistémicas y efectos sobre comportamiento. No se registró aumento de temperatura, reacciones en el sitio de inyección, efectos adversos ni alteraciones del comportamiento significativos al vacunar corderos entre 4 semanas y 8 semanas de edad y hembras en período de gestación. La vacuna es una preparación proteica purificada, no infecciosa, no tóxica, no contaminante. Se presenta liofilizada con la finalidad de prolongar su tiempo de almacenamiento y debe ser reconstituida antes de su aplicación. Esta vacuna podría incorporarse a otras vacunas bacterianas o en antiparasitarios, pero perdería la capacidad de ser liofilizada. (Lightowlers MW 1999).

3.-ESTUDIOS EXPERIMENTALES CON LA VACUNA EG95 EN LA ARGENTINA

Lightowlers integrante del “Grupo Científico de Trabajo sobre los adelantos en la prevención, el control y el tratamiento de la Hidatidosis” de la Organización Mundial de la Salud, publica en 1994: “*Infecciones por Echinococcus: Aspectos inmunobiológicos y de vacunación*”. El documento describe los resultados de dos investigaciones independientes, usando el antígeno recombinante de oncosferas para vacunar a los ovinos contra infecciones subsecuentes por huevos de *E. granulosus* logrando 95% y 97% de protección. Manifiestan que: “La investigación por colaboración entre el laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Melbourne y Ag Research de Nueva Zelanda han permitido la elaboración de una vacuna definida que protege a los ovinos contra infecciones repetitivas por *E. granulosus*. Es posible utilizar la vacuna como un medio para controlar la transmisión de los parásitos hídricos, en sus hospedadores intermediarios naturales, como parte de las campañas de lucha contra la EQ. En la parte final del documento escriben: “La Universidad de Melbourne y el organismo Ag Research investigan la participación de las compañías comerciales en el refinamiento de la vacuna. Además, será de máxima importancia la colaboración de otros grupos de investigadores que tengan interés en la epidemiología y la lucha contra la enfermedad hídrica, en la valoración de la vacuna en forma directa **sobre el terreno**, y seguramente será bien recibida”.

En 1995 el grupo de investigadores integrado por el Bioquímico Eduardo Fernández, el Médico Jorge Lago y los Veterinarios Jorge Iriarte y Oscar Jensen, profesionales del Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut de Argentina, recibieron el protocolo y 10 dosis de vacuna experimental EG95 en forma liofilizada, desde la Universidad de Melbourne, Australia. En la chacra N^a 18 de Sarmiento, perteneciente a la Dirección de Ganadería, Fernandez y Jensen, vacunaron los primeros corderos en América.

En 1997 se incorporó al grupo de la Dra. Paula Sanchez Thevenet del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT), de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut.

En la década de los 90 se realizaron ensayos en estudios experimentales multicéntricos, controlados y aleatorios, bajo un mismo protocolo en Australia, Nueva Zelandia, China y Argentina. Los resultados de potencia de la vacuna recombinante en ensayos a campo realizados fueron similares y concluyentes, con protección entre 83% y 99%, en los animales vacunados respecto a los controles, utilizando dos dosis de vacuna EG95. (Lightowlers MW 1999).

En Argentina se realizaron cinco ensayos con ovinos entre los años 1995 y 1999 y uno en caprinos en 2001. Los animales de los ensayos fueron corderos y chivitos de menos de 25 semanas, no expuestos a la infección por *E. granulosus*, que siguieron el calendario sanitario del establecimiento donde se realizó el ensayo. La vacuna liofilizada provista por Lightowlers de la Universidad de Melbourne, fue reconstituida una hora antes con agua destilada y aplicada en forma subcutánea en la ingle y/o la axila, a la dosis de 50 µg de la proteína EG95 y 1 mg de adyuvante Quil A, en un volumen de 1 ml. Los corderos y chivitos vacunados y testigos fueron desafiados por vía oral con aproxi-

madamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infectados, según el protocolo de cada ensayo. Entre los 8 y 14 meses de producida la infección, los ovinos fueron sacrificados bajo condiciones que permitieron el examen detallado de la res y de las vísceras, especialmente el hígado, los pulmones, los riñones, el bazo y el cerebro, que se cortaron en trozos de 1 a 2 mm, en búsqueda de quistes hidatídicos.

3.1.- ENSAYO ARGENTINA N° 1. CHUBUT, SARMIENTO. 1995.

Se inicia en mayo de 1995, con 20 corderos de raza Merino. Diez fueron protegidos con dos dosis de vacuna EG95 con 4 semanas de intervalo entre ambas dosis. Todos fueron desafiados 4 semanas después. Transcurridos 14 meses de efectuada la infección, todos los ovinos que finalizaron la prueba (7 del grupo vacunado y 10 testigos), fueron sacrificados en búsqueda de quistes hidatídicos. En todos los animales testigos se encontraron quistes hidatídicos, detectándose 232 quistes hidatídicos. En el grupo vacunado, un ovino presentó un quiste hidatídico viable de 2 mm.- La protección resultante fue del 99.4 %.

En 1999, Lightowlers y col., publicaron los resultados de tres ensayos realizados en ovejas inmunizadas con la vacuna experimental recombinante EG95 y desafiados con huevos de *E. granulosus* viables obtenidos en Nueva Zelandia (ciclo perro / oveja), Australia (ciclo dingo / canguro) y Argentina (ciclo perro / oveja). La vacunación con EG95 confirió un alto grado de protección (96-100%). Los ensayos demostraron que el 86% de las ovejas vacunadas eran completamente libres de quistes hidatídicos viables cuando se examinaron aproximadamente 1 año después. La vacunación redujo el número de quistes viables un 99 % en comparación con los controles no vacunados. (Lightowlers MW 1999).

3.2.- ENSAYO ARGENTINA N° 2.

CHUBUT, PUESTO BLANCO, SARMIENTO. 1996.

Se inicia en mayo de 1996, con 20 corderos de raza Merino, de 6 meses de edad. Diez fueron protegidos con tres dosis de vacuna EG95. Todos fueron desafiados. En el grupo testigo se encontró una media de 92 quistes hidatídicos. En el grupo vacunado no se encontraron quistes. La protección resultante fue del 100%.

3.3.- ENSAYO ARGENTINA N° 3.

CHUBUT, ESTANCIA MEDIA LUNA,
ALDEA BELEIRO. 1997.

Se inicia en abril de 1997, con 90 corderos, raza Merino de 6 meses de edad. El objetivo fue evaluar el número de dosis y tiempo de protección. Sesenta corderos fueron protegidos con una dosis de vacuna EG95 y treinta de ellos recibieron una segunda dosis a los 45 días. Treinta quedaron como testigos. Se realizaron desafíos en distintos grupos y tiempos. En los testigos examinados se encontraron una media de 219 quistes. Con una sola dosis de la vacuna se logró una protección del 85% para la infección con *E. granulosus* a los 3 meses de la última dosis y del 82% a los 12 meses. Con dos dosis de vacuna resultó una protección del 99% para 4 meses y del 98% para 11 meses post vacuna.

3.4.- ENSAYO ARGENTINA N° 4.

CHUBUT, SARMIENTO. 1997.

Se inició en mayo del 1997, en un lote de 10 ovejas de raza Texel, servidas en el otoño. El objetivo fue evaluar la transferencia calostrual de inmunidad. Las madres fueron protegidas con

dos dosis de vacuna EG95 y fueron desafiados sus corderos con 2.000 huevos de *E. granulosus*. La protección resultante fue del 98% hasta los 40 días de vida de los corderos.

3.5.- ENSAYO ARGENTINA N° 5.

CHUBUT, SARMIENTO. 1999.

Se inició en la primavera de 1.999 con ovejas de raza Texel previamente vacunadas. El objetivo fue evaluar la interferencia de la inmunidad calostrual. Se estudiaron los calostros, los sueros de sus corderos y los sueros de corderos hijos de madres no vacunadas. Todos los corderos fueron vacunados con una dosis de EG95, a los tres meses. Por un ensayo k-Elisa se evaluaron los sueros para determinar los niveles de actividad anticuerpo y por un ensayo inmunoblot los sueros y el calostro para revelar actividad anti-EG95. La inmunidad calostrual no interfirió con la respuesta de anticuerpos en los corderos vacunados.

3.6.- ENSAYO ARGENTINA N° 6.

NEUQUEN, JUNÍN DE LOS ANDES. 2001.

Se inició en mayo de 2001, con 40 caprinos, raza Angora de 6 meses de edad, divididos en cuatro grupos, en un establecimiento rural cercano a Junín de los Andes, en el marco del convenio de cooperación científica entre el Ministerio de Desarrollo Social de la Provincia de Neuquén y el Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut. El objetivo fue evaluar en caprinos, la vacuna recombinante EG95, bajo condiciones controladas. Los grupos a, b, y c fueron protegidos con una y dos dosis de vacuna Eg95 producida en 2001, 1999 y 1997 respectivamente y conservadas en forma liofilizada a 4 C°.- Fueron desafiados por vía oral con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infectados de la zona sur de Neuquén.

Se comparó la respuesta de anticuerpos anti *E. granulosus* obtenida en caprinos vacunados con EG95, en sueros caprinos que recibieron dos dosis de vacuna EG95, comparados con sueros ovinos de mismas características y tiempos, mediante IgGk-ELISA y Western Blot. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de anticuerpos protectivos contra *E. granulosus* en caprinos vacunados, comparable a lo demostrado en ovinos. A la necropsia no se encontraron quistes hidatídicos en los caprinos vacunados con dos dosis y se encontraron quistes hidatídicos (12 en pulmón y 1 en hígado) en el 15% de los caprinos con una dosis. Se hallaron quistes hidatídicos (159 en pulmón y 65 en hígado) en el 90% de los no vacunados. Los niveles de protección fueron similares a los detectados en ovinos y no se encontraron diferencias significativas en el nivel de protección entre la vacuna producida en 1997, 1999 y 2001.-

En 2003, Heath y col. publicaron una revisión sobre la formulación, aplicación de la vacuna, el progreso en el control de la EQ, dando recomendaciones para el uso en los Programas de Control. Describen la vacuna EG95, que protege a las ovejas, las cabras y bovinos contra la EQ. Apuntan aspectos que tienen que ver con la formulación, la seguridad, la eficacia de la vacuna, su esquema de aplicación, número de dosis, los desafíos y las necropsias, como así también las dificultades en áreas continentales de los programas que utilizan la desparasitación de los perros. Plantearon la utilidad de realizar dos visitas al año a cada establecimiento, realizando la desparasitación de los perros y la vacunación del ganado. Advirtieron que la vacuna no tiene efecto sobre los quistes establecidos y es esperable que la infección aumenta con la edad.

Concluyeron que una estrategia eficaz es comenzar un programa de control mediante la vacunación de todos los animales y debe ir acompañado de la educación sobre la EQ y el tratamiento antihelmíntico de los perros al menos dos veces en el año. (Heath DD 2003).

4.- ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE LA VACUNA EG95 EN CHILE

Ensayo Chile. Región del Bío-Bío, Chillán. (2001 – 2003). En año 2003 se evaluó un ensayo realizado en la Facultad de Veterinaria de Chillán, ubicado en la VIII región de Chile, realizado en ovinos de raza Suffolk que a la edad de corderos recibieron dos dosis de vacuna EG95 con el adyuvante Quil A, producida en el Ag Reserch de Nueva Zelandia, realizándose el desafío con proglótidos de *E. granulosus* obtenidos de perros de la región del Alto Bío Bío. A la necropsia, realizada 13 meses después de la segunda dosis, se detectaron 291 quistes en los 10 ovinos testigos y 3 quistes en los doce ovinos vacunados. (Vivallo Cuevas IO 2004).

5.- LA VACUNA EXPERIMENTAL EN LOS PROGRAMAS DE CONTROL

5.1.- CHINA 1996.

VACUNACIÓN A GRAN ESCALA.

David Heath realizó un ensayo a gran escala, a campo con desafío natural, en las provincias Qinghai y Xinjiang de China, vacunando 50.000 y 100.000 corderos. La vacuna EG95 protegió al menos 1 año luego de 2 vacunaciones, mientras que 3 vacunaciones pueden proteger 3 ó 4 años. Confirmó la seguridad y eficacia de la vacuna.

5.2.- ARGENTINA, CHUBUT. EL CHALIA.(2007–2013).

VACUNACIÓN DE OVINOS Y CAPRINOS.

En la colonia aborigen “El Chalia”, ubicada al suroeste de la Provincia del Chubut, se realizó un ensayo a campo, utilizando la vacuna experimental EG95 provista en forma liofilizada por la Universidad de Melbourne de Australia, con el objetivo de evaluar la vacuna como herramienta de control. A la colonia aborigen, entre los años 1984 y 2015, la habitaron un promedio de 20 familias de origen mayoritariamente tehuelche, que en conjunto pastorearon un promedio de 1.500 caprinos y 10.000 ovinos en 30.000 hectáreas. Mantuvieron un promedio de 100 perros, mayoritariamente de razas ovejeras.

En 1984 el programa de Control de EQ, que depende del Ministerio de Salud, inició en el sur de la provincia del Chubut, sus actividades de control, basadas en la desparasitación periódica de los perros y la educación sanitaria de la población. En la colonia "El Chalia", en el diagnóstico inicial, mediante la prueba de la arecolina, se detectó que el 55% de los perros tenía el parásito que produce EQ y encuentran perros parasitados en el 73% de las viviendas. El programa de Control de la Hidatidosis de la provincia del Chubut, realizó tareas de desparasitación canina y educación sanitaria, en forma ininterrumpida desde el año 1984 al año 2007.

Al inicio del programa de vacunación en diciembre de 2007, el 25% de los perros tenía *E. granulosus* y había perros parasitados en el 72% de las viviendas, medidos por la prueba de la arecolina. En el verano, en coincidencia con los trabajos de esquila y los baños sanitarios obligatorios, se realizó la aplicación de la vacuna, a cargo del Ministerio de Salud, contando con la colaboración de técnicos de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). En las 7 temporadas de vacunación se tuvieron dificultades para vacunar los ovinos y caprinos de todos los establecimientos y también para aplicar en cada establecimiento las dos dosis de vacunas a todos los corderos y chivos.- En la evaluación de la situación hidatídica de la colonia aborígen "El Chalia", realizada dos años después de finalizado el programa de vacunación, en abril de 2015, por la prueba de la arecolina se encontraron dos perros (2%) con *E. granulosus*, que pertenecía a dos viviendas (11%). En los perros de siete viviendas se encontraron *T. hydatigenas*. La vacuna fue eficaz para reducir la Echinococosis canina.

5.3.- ARGENTINA RÍO NEGRO. (2009 – 2015). VACUNACIÓN DE OVINOS.

En el año 2009 la provincia de Río Negro inicia un ensayo de control con vacuna producida en la Universidad de Melbourne, de Australia, con el objetivo de evaluar el impacto de la introducción de la vacuna EG95 en la interrupción del ciclo de transmisión y analizar la factibilidad técnico operativa de su aplicación en condiciones de campo. El programa se aplica en el sur de la Provincia de Río Negro en un área con cuatro comunidades aborígenes, estableciendo un área vecina y de similares características como área control, donde no se aplicó la vacuna.

El programa de control con la vacuna incluye solo al ganado ovino, quienes recibieron dos dosis en cordero y una sola dosis de refuerzo a 1-1,5 años de edad. Se logró una reducción estadísticamente significativa del 62% en la prevalencia de la infección, en el número de granjas infectadas, en el número de quistes / animal infectado y en el tamaño de los quistes de los animales vacunados en comparación con los controles no vacunados de la misma edad. Se plantaron las dificultades encontradas para aplicar la vacuna y se concluyó que la vacuna fue capaz de prevenir la infección. (Larrieu E 2013 y Larrieu E 2015).

6.- LA VACUNACION EN HUMANOS CONTRA EQ

Al finalizar el siglo veinte, Lightowlers en un documento de discusión sobre “*La vacunación de los seres humanos contra la hidatidosis*”, plantea para las regiones donde no sea posible aplicar la vacuna en los animales o no se puedan ejecutar medidas de control, la necesidad de disponer de una vacuna que se aplique directamente en el hombre. En su opinión, la vacuna de uso animal tendría un excelente potencial para desarrollar la primera vacuna humana eficaz contra una enfermedad parasitaria.

En 2000, Lightowlers y col. publicaron una revisión sobre los progresos de la vacuna contra EQ en los ovinos y la cisticercosis en los bovinos. Tal éxito en los animales fomenta la investigación de la utilización potencial de las vacunas en seres humanos para prevenir la enfermedad hidatídica derivada de la infección por *E. granulosus* (Lightowlers MW 2000).

En sintonía con dicha intención, el Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut, en el año 2000, a través del Departamento de Zoonosis conducido por el Méd. Vet. Jorge Iriarte, elaboran y promueven un proyecto tendiente a solicitar la cooperación técnica y financiera para desarrollar una vacuna de uso humano que evitara la enfermedad en la Patagonia. El proyecto partía de la base que las dificultades existentes para controlar

la enfermedad mediante los métodos habituales tales como la educación sanitaria, la desparasitación de canes, el control de faena, aconsejaban avanzar en una investigación para encontrar una vacuna que dotara de inmunidad a la población humana susceptible de contraer la enfermedad, fundamentalmente los niños de corta edad. La propuesta, que llegó a ser analizada en el propio Ministerio de Salud de la Nación, nunca logró el financiamiento requerido.

7.- LA BUSQUEDA DE UN LABORATORIO PRODUCTOR DE LA VACUNA

En 1999 se inició la búsqueda de un laboratorio que quisiera producir la vacuna en forma industrial, visitando los Ministerios de Salud y de Ganadería de Argentina y laboratorios de productos veterinarios y médicos de Argentina, Uruguay y Chile. La mayoría de los directores técnicos de los laboratorios se interesaron en la vacuna experimental EG95, la primera vacuna contra un parásito que afecta a los animales y al hombre, pero solo Biogénesis y Rosenbuch de Argentina, manifestaron interés en producirla.

En 2001, el laboratorio de productos veterinarios Biogénesis de Argentina firma un acuerdo de confidencialidad con el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Melbourne en Australia y el Centro de Investigación Animal de Nueva Zelanda, por los derechos de la vacuna. Años después desistieron del proyecto, por considerarlo **“no rentable”**.

En 2008, el laboratorio Tecnovax SA de Argentina se interesa en la vacuna y firmó un acuerdo comercial con la Ag Research de Nueva Zelanda y la Universidad de Melbourne de Australia, iniciando posteriormente los trámites ante el SENASA Argentina, para producir y comercializar la futura vacuna en América y Europa.

En 2009 el Centro de Virología Animal del ICT-Milstein, perteneciente al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) de Argentina y bajo la dirección de los investigadores José La Torre y Verónica Poggio, inician la transferencia de la tecnología desde la Universidad de Melbourne de Australia y del Ag Research de Nueva Zelanda, con el objetivo de desarrollar la vacuna recombinante EG95 en Argentina, asegurando su efectividad y su bioequivalencia con la vacuna experimental EG95, logrando una vacuna adaptada a las necesidades de la región sudamericana. Esta tarea fue realizada con el apoyo de la Agencia Nacional de Promoción Científica.

8.- LA PRODUCCION DE LA VACUNA EG95 A ESCALA INDUSTRIAL

En enero de 2011 el Registro Nacional de Productos Veterinarios dependiente del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), aprueba el registro de la vacuna Providean Hidatil EG95® del laboratorio argentino Tecnovax SA. Providean Hidatil EG95®, es la primera vacuna recombinante de uso veterinario contra la enfermedad hidatídica, con producción a escala industrial. Tecnovax SA es una compañía biofarmacéutica que desarrolla, produce y comercializa vacunas y productos biológicos para sanidad animal, fundada en el 2003.

Providean Hidatil EG95®, es una vacuna recombinante, proteica, altamente estable, segura y amigable con el medioambiente. Contiene 50 µg de proteína recombinante por dosis, emulsionada con 0,125 mg/dosis de saponina y con adyuvante oleoso Montanide ISA70. Es producida en células procariotas que expresan en su espacio intracelular la proteína EG95. El gen que codifica la proteína EG95 fue clonado a partir del material genético presente en huevos de *E. granulosus* y expresado en bacterias *Escherichia coli*, las cuales fueron posteriormente inactivadas. La bacteria *Escherichia coli* transformada con un Vector plamídico de expresión que porta los genes de la proteína glutatión S-transferasa del *Schistosoma japonicum* (GST) y EG95 bajo

control del promotor inducible por isopropil tio-b-D-galactósido (IPTG,) produce grandes cantidades de la proteína de fusión EG95 de aproximadamente 40 kDa (el tamaño de EG95 sin GST es 16 kDa) en el citoplasma bacteriano como cuerpos de inclusión. La proteína recombinante EG95, es posteriormente solubilizada y purificada dando lugar al antígeno recombinante, el cual se caracteriza por métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares para garantizar la calidad del producto obtenido.

La vacuna recombinante formulada con el antígeno purificado no es patogénica, no contiene microorganismos que pongan en peligro la seguridad del animal vacunado. No usa pesticidas, ni químicos. Es inocua y segura. Puede aplicarse a hembras preñadas. Puede aplicarse en animales con EQ, porque se puede distinguir mediante análisis serológicos animales vacunados de infectados. La vacuna protege a los hospedadores intermedios por al menos un año, previene que los parásitos lleguen a los perros y éstos diseminen los huevos, reduciendo la biomasa parasitaria en el medioambiente, interrumpiendo así, el ciclo de la enfermedad y evitando que las personas contraigan la enfermedad.

En septiembre 2011 el laboratorio de productos biológicos Tecnovax SA, junto a los Ministros de Ciencia, de Industria, de Agricultura y Ganadería, de la República Argentina, anuncian la puesta en el mercado de la vacuna recombinante denominada Providean Hidatil EG95®, **la primera vacuna efectiva contra un parásito, disponible para su utilización por los propietarios de ganado y los programas de Control de la Hidatidosis.**

9.- LOS ENSAYOS CON LA VACUNA EG95 PRODUCIDA EN ARGENTINA

9.1.- ENSAYO ARGENTINA N° 1.

CHUBUT, ESTANCIA “LA ISLA” (2009–2015).
EN OVINOS

En mayo de 2009, en la estancia “La Isla”, en Península Valdés (Chubut), se inició un ensayo con el objetivo de monitorear la inmunidad y protección conferida por la vacuna EG95 producida en Argentina y la vacuna experimental EG95 producida en Australia. Fue realizado en una región típica de la meseta patagónica sur, con escasas precipitaciones, inviernos fríos y veranos calurosos. Los animales cumplieron el ciclo reproductivo y productivo de la majada del establecimiento. Participaron cincuenta ovinos, divididos en cuatro grupos, que recibieron 50µg de EG95 por dosis, con adyuvante acuoso Hidróxido de Aluminio, con adyuvante oleoso Montanide, ambas producidas en el CEVAN – CONICET de Argentina y con adyuvante saponina Quil A, producidas en la Universidad de Melbourne de Australia. Un grupo recibió un placebo. Los animales recibieron cuatro dosis de vacuna (V1, V2, V3 y V4) a los 01, 32, 455 y 1405 días. El ensayo duró 2.122 días, 69 meses o casi 6 años y para su evaluación fue dividido en dos etapas:

a.- Seguimiento serológico (2009-2013) y

b.- Desafío y necropsia (2013-2015).

Al día 1405 del ensayo, a la edad de 55 meses de los ovinos, fueron evaluados los títulos de IgG anti-Eg95 inducidos en ovinos inmunizados con 2 y 3 dosis de distintas formulaciones del antígeno EG95. (Técnica ELISA). Sus resultados permitieron determinar que la inmunidad conferida por la vacuna EG95 producida en Argentina, con adyuvante oleoso Montanide ISA70, denominada Oleosa CEVAN, medidas en muestras de sangre a los 32, 57 y 455 días luego de aplicada dos dosis (V1 y V2) y a los 730 y 1405 días luego de aplicada un refuerzo anual (V3) fue equivalente a la vacuna experimental de Australia. La protección inducida por la vacuna EG95 con adyuvante oleoso, fue superior a la formulación con adyuvante acuoso Hidróxido de Aluminio, denominada Acuosa CEVAN. Su horizonte de protección luego de aplicada la tercera dosis (V3) es superior a los dos años.

La segunda parte del ensayo se inicia al día 1405, con la aplicación de una cuarta dosis (V4) a 16 ovinos. El desafío fue realizado por vía oral a 40 ovinos, con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infestados, luego de 38 días de aplicada la cuarta dosis (V4) y luego de 989 días de aplicada la tercera dosis en 15 ovinos (V3). La necropsia para evaluar el número de quistes hidatídicos viables y no viables, fue realizada a los 32 ovinos que finalizaron el ensayo, en marzo del 2015. En los tratamientos con tres dosis (V3) y el desafío a los 33 meses (988 días), dando el máximo de chances al parásito, la formulación con adyuvante oleoso dio una protección del 85%, reduciendo el número de quistes viables, en comparación al control negativo. En los grupos de ovinos con cuatro dosis (V4) y el desafío al mes (38 días), dando el máximo de chances a la vacuna, se logró una alta protección con las tres formulaciones, en comparación al control negativo. Se logró una protección del 94% con la vacuna de Australia, del 95% con la oleosa de Cevan, y 88% con la vacuna acuosa de Cevan.

Conclusiones: Todas las formulaciones lograron reducir la biomasa de quistes disponibles con capacidad de infestar a los perros. La inmunidad a largo plazo luego de tres dosis (V1 y V2 como cordero) y un refuerzo (V3), con el desafío 33 meses después, con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, logró una protección del 85%. La vacuna producida en Argentina con adyuvante oleoso logró mejor protección que la vacuna con adyuvante acuoso. La protección inducida por la vacuna oleosa producida en Argentina y la vacuna experimental producida en Australia, fueron equivalentes. (Poggio TV 2016).

9.2.- ENSAYO ARGENTINA N° 2.

JUJUY, ABRA PAMPA (2011 – 2013). EN LLAMAS

Se inició en septiembre de 2011, en un lote de treinta llamas (*Lama glama*), en las instalaciones del INTA Abra Pampa, departamento Cochinocha, Provincia de Jujuy. Los departamentos Cochinocha y Yavi, de la Puna Argentina, concentran la mayor cantidad de llamas y ovinos de la Puna, todos pertenecientes a pequeños productores y la EQ es la principal zoonosis. Es el primer ensayo realizado en el mundo con la vacuna EG95 ya sea de origen industrial o experimental en camélidos sudamericanos domésticos. Tres grupos de llamas menores de 8 meses, fueron vacunadas a los días 0, 30 y 439 días con 3 dosis de la vacuna EG95 recombinante Hidatil EG95 (50 µg Eg95, 0,125 mg saponina, Montanide ISA 70 Seppic/dosis/mL) producida en Argentina (n=10), con vacuna recombinante experimental EG95 producida en Australia (50 µg Eg95, 1 mg QuilA/dosis/mL) (n=10). El grupo control (n=10) recibió solo placebo (adyuvante oleoso). La vacunación se realizó en la cara interna del muslo por vía subcutánea. En la primera dosis se utilizó la zona derecha y en la segunda dosis la izquierda, con jeringas individuales descartables tipo insulina.

Se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 180, 439 y 764 días post primo vacunación. El estudio consideró la inmunogenicidad inducida por la vacuna Hidatil EG95 y su comparación con la vacuna experimental australiana. Las diferencias entre los niveles de anticuerpos séricos inducidos por la vacuna industrial EG95 presentan diferencias no significativas ($>0,05$) comparados con la formulación experimental. Luego del refuerzo, los títulos séricos aumentan y son de similar magnitud (439 dpv) a los observados al día 30 (con una dosis) en los animales vacunados con ambas formulaciones y a 764 dpv son aún mayores que los observados al día 30 con 1 dosis y similares a los observados a los 180 días respectivamente. Se observa que los animales vacunados con la formulación EG95 argentina indujeron niveles y títulos de anticuerpos significativos y mayores a los obtenidos en el grupo control y similares a los de la vacuna australiana. (Poggio TV 2016).

9.3.- ENSAYO ARGENTINA N° 3.

BUENOS AIRES, BRANDSEN. (2011-2012).

EN OVINOS

Se inició en noviembre del 2011, en dos lotes de 14 y 29 corderas y ovejas de raza Merino, en Estación Gomez y Coronel Brandsen, en Provincia de Buenos Aires. Finalizó en noviembre de 2012. Los animales fueron separados en tres grupos: Control (n=15), vacunados con Vacuna Hidatil EG95 (50 μ g Eg95, 0,125mg saponina, Montanide ISA 70 Seppic/dosis/mL) producida en Argentina (n=20) y vacunados con vacuna recombinante experimental EG95 australiana (50 μ g Eg95, 1 mg QuilA/dosis/mL) (n=15). Los animales fueron inmunizados con 1 dosis de cada vacuna EG95 por vía subcutánea en la región inguinal y se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 180 y 360 días post primo vacunación. El monitoreo de producción de anticuerpos IgG anti-EG95 en los animales vacunados y con-

troles fue realizado mediante estudios serológicos seriados por técnica de ELISA. Los grupos vacunados ya sea con Providean Hidatil EG95 o vacuna australiana, mostraron títulos séricos que persistieron por 12 meses, mostrando un pico a los 60 dpv. No se observaron diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos inducidos por las distintas formulaciones, ni en los títulos de anticuerpos detectados. Se asocia con un alto grado de protección que el grupo de ovinos vacunados, presentan una absorbancia de anticuerpos cercana o mayor a 0.8 (dil 1:200).

9.4.- ENSAYO ARGENTINA N° 4.

BUENOS AIRES, CARMEN DE ARECO, (2013 – 2014).

EN BOVINOS

Se inició en abril de 2013, en un lote de 65 bovinos de raza Hereford, en la localidad de Rawson, Carmen de Areco, Ruta 51, km 146, Provincia de Buenos Aires, con el objetivo de determinar la dosis efectiva y segura de la vacuna EG95, en bovinos.

Se separaron del rodeo, sesenta y cinco (n=65) bovinos (*Bos taurus*) menores de 6 meses de raza Hereford, con aproximadamente tres meses de edad y se identificaron con caravana. Los animales siguieron el plan de manejo y sanitario del establecimiento donde se realizó el ensayo. Se formaron 7 grupos de 5 animales, tomados al azar, los cuales fueron inmunizados a 0 y 30 días, con distintas formulaciones: con 100 μ g, 150 μ g, 200 μ g, y 300 μ g de EG95, con 1,4 y 2,1 ml de Montanide ISA70 y con 0.250mg y 0.375mg de saponina. La vacuna se administró por vía subcutánea en el tercio medio superior de la tabla del cuello. La primera dosis de la derecha y la segunda en la izquierda, con jeringas individuales descartables. Cambios en el comportamiento, temperatura corporal y reacciones en el sitio de inoculación, fueron observados y recopilados, a las 2, 6, 24, 48, 72 hs y a día 4, 5, 6 y 7 días de colocada la primera y segunda dosis de

la vacuna. Se tomaron muestras séricas en los días 0, 30, 60 y 180 días y se determinó el nivel de anticuerpos séricos anti EG95 en cada grupo de animales: vacunados y testigos a los diferentes tiempos por técnica de ELISA.

Conclusión: Por los estudios de seguridad y evaluación dosis-respuesta, la formulación con 100 μ g de EG95 y adyuvante oleoso con 0.250mg saponina y 1,4 ml de Montanide ISA70, en un volumen de 2 ml, resultó ser la más segura y eficaz, para la aplicación en bovinos.

9.5.- ENSAYO ARGENTINA N° 5.

CHUBUT, SARMIENTO (2012–2013).

EDAD A LA PRIMERA DOSIS

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto. El cordero nace con su aparato digestivo adaptado a una dieta láctea, propia de un no-rumiante. Paulatinamente van transformando su alimentación, al comenzar a ingerir pasto alrededor de las tres semanas de vida, para ser rumiante adulto a las ocho semanas. Al momento de ingerir pasto, comienza su riesgo de ingerir huevos de *E. granulosus*, debiendo estar protegido por los anticuerpos calostrales o anticuerpos inducidos por la vacuna.

Con el propósito de testear la seguridad y eficacia de la vacuna administrada en ovinos a partir de las cuatro semanas de vida, se formarán 3 grupos de 10 corderos de raza Merino, tomados al azar del corral, identificados con doble caravana, con aproximadamente 4 semanas de edad, pertenecientes al Centro de Investigación en Zoonosis en Sarmiento, Chubut. A cada grupo se les administró la vacuna Providean Hidatil EG95®, la vacuna recombinante australiana EG95-GST y un placebo sin antígeno proteico EG95 respectivamente. Se midió la inmunidad confe-

rida en muestras de sangre tomadas a los 0, 30 y 60 días post vacunación, mediante un ELISA para detección de anticuerpos séricos anti-EG95. Los niveles de anticuerpos detectados fueron equivalentes para las dos formulaciones y similares a los obtenidos en los ensayos con aplicación de las vacunas a partir de los tres meses. No se observaron cambios en la temperatura corporal, el comportamiento y reacciones en el sitio de inyección, en los días posteriores a las dos vacunaciones.

9.6.- ENSAYO ARGENTINA N° 6.

CHUBUT (2012-2013)

INMUNIDAD CALOSTRAL EN OVINOS

Con el objetivo de detectar la presencia, en función de la edad, de los anticuerpos (Ac) anti-EG95 transferidos por el calostro, en corderos nacidos de madres vacunadas con Providean Hidatil EG95® y determinar el momento ideal para la aplicación de la primera dosis de vacuna, ovejas Merino destinadas a vientre del Centro de Investigación en Zoonosis en Sarmiento, Chubut, fueron divididas en dos grupos: M1: una única dosis de vacuna 45 días antes de la fecha de parición; y M2: primera dosis 30 días antes de la fecha de servicio, y la segunda dosis 45 días antes de la fecha de parición. Después del parto, y durante 28 días, se extrajo suero y calostro/leche en cada grupo. Se definieron dos poblaciones de corderos recién nacidos: C1 y C2 según fueran hijos de M1 o M2. Inmediatamente después del nacimiento, y durante 90 días, se extrajeron muestras de suero. Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-EG95 para cada muestra de cada grupo de madres (suero/calostro) y corderos (suero) en diferentes tiempos. Se observó que en todos los animales expuestos a dos dosis de vacunación los títulos séricos de Ac IgG anti EG95 fueron significativamente mayores a los expuestos a una única dosis. En el suero de los corderos el pico máximo de Acs se detectó a las 24 hs posteriores al parto, manteniéndose

Los primeros ensayos en Argentina con la vacuna experimental EG95.
Sarmiento – Provincia del Chubut. 1995 - 1999



*16 de Junio de 1995.
 Primer ovino vacunado con EG95.
 Sarmiento - Chubut. Argentina*



*Realizando el desafío con 2000
 huevos de Echinococcus granulosus*



Veterinario Jorge Iriarte, Bioquímico Eduardo Fernández, Veterinario Oscar Jensen, Dr. Marshall Lightowlers (Australia), Bióloga Gloria Cerrone y Dr. David Jenkins, (Jefe programa de Australia), camino al matadero de Andrés Marinoni en Sarmiento, Chubut, para realizar las necropsias. (1997)

Los primeros ensayos en Argentina con la vacuna experimental EG95.
Sarmiento – Provincia del Chubut. 1995 - 1999



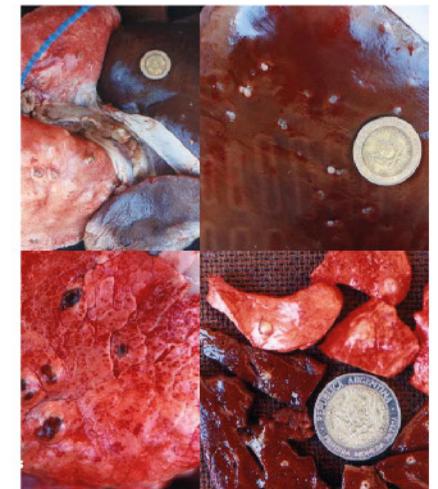
Bioquímica Paula Sanchez, Marshall Lightowlers, Veterinarios Jorge Iriarte, Oscar Jensen y Bioquímico Eduardo Fernández. Buscando quistes hidatídicos en vísceras ovinas, en el Matadero de Rolando Berón en Sarmiento, Chubut. (Diciembre 1.998)

TAL DE OVINOS CON EG95 «EXPERIENCIA Nº 1»
 Sarmiento - Chubut - Argentina
 ECINTO Nº 656 FECHA: 1/2 11298

#	2-5	5-10	>10	Total	Revisión
1	1	1	1	3	Planos
2	1	1	1	3	Planos
3	1	1	1	3	Planos
4	1	1	1	3	Planos
5	1	1	1	3	Planos
6	1	1	1	3	Planos
7	1	1	1	3	Planos
8	1	1	1	3	Planos
9	1	1	1	3	Planos
10	1	1	1	3	Planos
11	1	1	1	3	Planos
12	1	1	1	3	Planos
13	1	1	1	3	Planos
14	1	1	1	3	Planos
15	1	1	1	3	Planos
16	1	1	1	3	Planos
17	1	1	1	3	Planos
18	1	1	1	3	Planos
19	1	1	1	3	Planos
20	1	1	1	3	Planos

163 [111 viables
 52 no viables]
 EL ÚLTIMO DE EG95!
 !! FELICIDADES !!

Planilla de registro



Pulmones, hígado y cortes de pulmón, hígado y bazo con quistes hidatídicos. Nueve meses post desafío.

Vacunación con EG95 en LLAMAS
 Abra Pampa – Jujuy – Argentina (2011 – 2013)



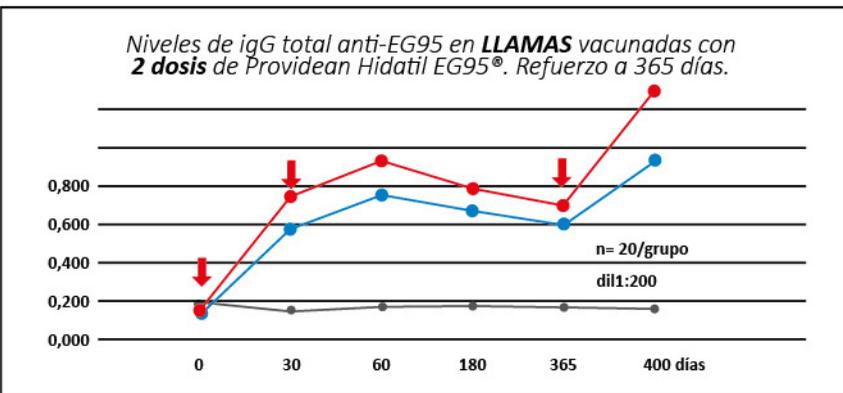
Profesionales y técnicos de la Estación Experimental Agropecuaria INTA, Abra Pampa, Provincia de Jujuy, que llevaron adelante el ensayo.



La Veterinaria Sandra Romero del INTA Abra Pampa, responsable local del ensayo, vacunando la primera Llama.



16 de Septiembre de 2011
 Primer camélido vacunado con EG95
 Abra Pampa - Jujuy - Argentina



La Vacuna experimental EG95 como medida de control en ovinos y caprinos.
 Colonia aborigen "El Chalia", Chubut, Argentina

Perros con *Echinococcus granulosus* a la prueba de la arecolina. Marzo 2015

Año	Total viviendas	Viviendas evaluadas	Viviendas con perros +	% viviendas con perros +	Total Perros	Perros evaluados	Perros con Eg	% con Perros con Eg
1984	21	15	11	73%	91	49	27	55%
2007	20	11	8	72%	90	48	12	25%
2015	20	18	2	11%	99	76	2	2%

1.984: Inicio del programa: Educación sanitarias + desparasitación canina.
 2.007 a 2013: Programa de vacunación.

En 7 viviendas (38 %), se tiene seguridad de que no se había desparasitado los perros, por la presencia de *Taenia hydatigena*, de hasta 3 metros de largo.



Ubicación El Chalia.
 Chubut.



Se realizó la prueba de la arecolina en todas la viviendas de la colonia "El Chalia". (2015)



Taenia hydatigena encontrada en uno de los perros. (2015).
 Técnico agropecuario Carlos Terán

**La Vacuna experimental EG95 como medida de control
en ovinos y caprinos.
Colonia aborigen "El Chalia", Chubut, Argentina**



Agente sanitario Manuel Soto, Dr Marshall Lightowlers, Veterinaria Mafalda Mossello y agente sanitario Seferino Millatruz, saliendo a vacunar.



La Veterinaria Paola Anmiotti del SENASA vacunando en "El Chalia".



Marshall Lightowlers y los chivos de la Colonia aborigen "El Chalia"

**Monitoreo de la inmunidad conferida por la vacuna EG95 producida
en Argentina y la vacuna experimental EG95 producida
en Australia, en ovinos de Argentina.
Los ensayos de "La Isla", Chubut, Argentina 2009 – 2015**



Animales del ensayo en el Establecimiento "La Isla", en Península Valdés, Chubut.



El Veterinario Jorge Iriarte aplicando la primera dosis de vacuna EG95 producida en Argentina.



Uno de los grupos del ensayo y la vacuna codificada.

Monitoreo de la inmunidad conferida por la vacuna EG95 producida en Argentina y la vacuna experimental EG95 producida en Australia, en ovinos de Argentina.

Los ensayos de "La Isla", Chubut, Argentina 2009 – 2015



Grupo evaluador integrado por Laura Gertiser, Verónica Poggio David Heath buscando quistes hidatídicos en los animales vacunados y testigos.



Grupo evaluador integrado por Jorge Iriarte, Mafalda Mosello y Gabriel Aviles, buscando quistes hidatídicos en los animales del ensayo.



El doctor David D Heath, investigador del Ag Research de Nueva Zelandia buscando quistes hidatídicos.

La vacuna recombinante EG95 en los programas de control XI Región de Aysén, República de Chile, Mayo de 2016. VIII Región del Bio Bio, República de Chile, Noviembre de 2016.



Oveja adulta Texel, primer ovino vacunado con EG95, de producción industrial, junto al Vet Julio Cerda, Director Regional del SAG de la región de Aysen, el Investigador Oscar Jensen de Argentina, el Vet Tomás Chacón Saravia responsable del programa del SAG y el Vet Ángel Sartori, Director Nacional del SAG de Chile, en la XI Región Aisén de la República de Chile. Mayo de 2016.



Veterinarios Claudio A. Muñoz Cardenas del SAG, Guido Merino Rubilar Jefe SAG, Oscar Jensen y Alejandro Pino, junto a productores y vacunadores en el Alto Bio Bio, VIII Región de la República de Chile. Noviembre de 2016.

en niveles protectivos altos hasta los 28 días y con niveles protectivos hasta el día 75. Los resultados indican que los Acs IgG anti-EG95 se concentran significativamente en el calostro de las ovejas previo al parto originándose la transferencia efectiva de los anticuerpos al cordero. Teniendo en cuenta la persistencia en suero de los Ac vacunales adquiridos por los corderos en forma pasiva, sería ideal iniciar la vacunación a partir de la cuarta semana de vida de los corderos hijos de madres vacunadas.

10.- MONITOREO DE LA INMUNIDAD ALCANZADA POR LA VACUNA

La potencia y eficacia de la vacuna se determina a través del desafío de los animales vacunados con huevos de *E. granulosus* y su posterior necropsia para determinar la reducción en el desarrollo y número de quistes hidatídicos viables con respecto a los animales no vacunados. Este ensayo es el “gold estándar” para evaluar el grado de protección del inmunógeno. Es una prueba que lleva aproximadamente 18 meses, desde la vacunación de los animales, el desafío con *E. granulosus* hasta el desarrollo de los quistes, con la desventaja de mantener animales infestados y sacrificarlos al final del ensayo.

10.1.- MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI EG95

Por estudios serológicos podemos medir el nivel de Ac vacunales producidos por la vacuna y también estimar la cobertura lograda por los vacunadores, en la aplicación de la vacuna. El monitoreo de producción de anticuerpos IgG anti-EG95 en los animales vacunados y controles es realizado mediante estudios serológicos seriados por técnica de ELISA.

Procedimientos ELISA: Se sensibiliza una placa de ELISA con antígeno EG95 (similar al utilizado en la formulación de la vacuna). Los sueros se diluyen y se incuban en esta placa para que

se produzca la reacción Ag-Ac. Después de varios lavados se agrega una Ig anti ovino marcada con una enzima peroxidasa. Esta va a acoplarse en las muestras en que se produjo la reacción Ag-Ac. La enzima se enfrenta con un sustrato productor de color, este color se mide con un lector de placas. La intensidad del color (DO) es directamente proporcional a la concentración de Ac de la muestra. Se grafican los valores de DO para cada uno de los muestreos y así visualizar el nivel de los mismos a media que transcurre el tiempo.

10.2.- TEST DE LA ONCÓSFERA

Debido a que la protección inducida por la vacuna está medida por anticuerpos específicos anti-EG95 a través de su unión al complemento y éstos tienen la capacidad de lisar oncósferas activadas “*in vitro*”, el diseño, desarrollo y estandarización del “Test de la Oncósfera” permitirá evaluar el grado de protección inducido por los Ac específicos, evitando la infestación con huevos de *E. granulosus* y la necropsia de los animales involucrados en los ensayos.

11.- ESQUEMA Y DURACION DEL PROGRAMA DE VACUNACION

Para determinar el esquema y las fechas de vacunación, a utilizar en cada establecimiento agropecuario o región bajo programa, debemos tener en cuenta el riesgo de contraer EQ, el ganado a vacunar, el tipo de manejo del ganado, las condiciones climáticas y los calendarios sanitarios y de manejo.

11.1.- EL ESQUEMA “IDEAL”

Al inicio del programa, vacunar a todos los animales susceptibles dos veces, con aproximadamente un mes de diferencia, incluyendo los animales jóvenes en el momento del destete. En el segundo año y posteriores, vacunar a todos los animales recién nacidos dos veces, aproximadamente con un mes de diferencia. Una sola vacunación de refuerzo a todos los animales vacunados previamente. Si se ingresan animales al establecimiento, vacunar con dos dosis, con un mes de diferencia. (Lightowlers, Seminario de Hidatidosis, Santiago de Chile, 2016)

11.2.- EN RUMIANTES MENORES EN PATAGONIA SUR

En el inicio del esquema de vacunación aplicar dos dosis a todos los animales. La primera en los trabajos previos a la parición

y la segunda en la esquila. Los corderos y chivitos recibirán la primera dosis en la señalada. Durante los trabajos de esquila de los adultos, se aplica la segunda dosis a los corderos y chivitos y se completa el esquema en el resto de los rumiantes menores. En zonas de alto riesgo aplicar un refuerzo anual a todos los rumiantes en los trabajos previos a la parición; con el objetivo de fortalecer la inmunidad calostrual y proteger a los rumiantes menores que pastan en los potreros cercanos a los cascos y/o puestos, que generalmente son los animales de mayor valor, como los reproductores y animales de consumo. En zonas de bajo riesgo aplicar un refuerzo anual a las madres en los trabajos previos a la parición. En las chacras, granjas y pequeños establecimientos, donde se practica el encierre nocturno y/o que los rumiantes menores pastan cerca de la vivienda del productor y sus perros, los animales deberían mantener un nivel de anticuerpos protectivos alto. Los corderos y chivitos deben recibir la primera dosis a las 4 semanas de nacidos. En los sistemas de veranada-invernada los rumiantes menores deberán iniciar los arreos hacia las veranadas, con un nivel alto de anticuerpos; con la segunda dosis y/o el refuerzo anual aplicado.

11.3.- EN RUMIANTES MENORES Y MAYORES EN ZONAS ENDÉMICAS

En el inicio del Programa de Control utilizando la vacuna, a partir del mes de vida aplicar la primera dosis a corderos, chivos y terneros. Al menos treinta días después, aplicar la segunda dosis. A los animales adultos aplicar una dosis. En los años posteriores, a partir del mes de vida aplicar la primera dosis a corderos, chivitos y terneros y al menos treinta días después aplicar la segunda dosis. Aplicar un refuerzo anual a todos los animales. A las madres para asegurar la transferencia de inmunidad calostrual y a los machos castrados, porque desde éste grupo sale la mayoría de los animales destinados a la faena familiar.

11.4.- LA DURACIÓN DEL PROGRAMA DE VACUNACIÓN

Como la vacuna no afecta a los quistes hidatídicos establecidos en los animales, el esquema de vacunación se debe mantener durante los años necesarios para la reposición de todo el ganado del establecimiento. Esta reposición es diferente según el tipo de ganado, el sistema productivo y el manejo de los animales. Influyen las ventas y compras de animales, el estado de los pastizales y las condiciones climáticas, que son distintas año a año, para cada región.

12.- LA VACUNA RECOMBINANTE DE PRODUCCION INDUSTRIAL EN LOS PROGRAMA DE CONTROL

El mayo de 2016, en el predio Miraflores, ubicado en el sector de Cerro Galera Chico, cercano a la localidad de Balmaceda, en la provincia de Coyhaique, de la XI Región Aisén de la República de Chile, se aplicó a una oveja adulta de raza Texel, la vacuna recombinante EG95 de producción industrial.

De esta forma la división Protección Pecuaria Regional, del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la Región de Aysén dió inicio al programa de control de la EQ, utilizando la vacuna Providean Hidatil EG95®, como medida de control. Este programa, coordinado por el Veterinario Tomás Chacón, incluyó 30 rebaños con aproximadamente 4.000 ovinos, distribuidos en “Galera Chico” en la localidad de Balmaceda y en “El Maitén”, en la comuna de Cochrane, XI Región Aisén, Chile.

En Noviembre de 2016 en el Alto Bio Bio, VIII Región de la República del Chile, zona de pequeños productores, la mayoría Pehuenches, con casos de Hidatidosis en chicos, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), incluyó la vacunación como herramienta de control, en el programa de control de la hidatidosis, donde el Seremí Salud realiza atención en la personas y desparasita los perros y los los municipios realizarán control de la población

canina. El programa de vacunación que incluye 15.000 ovinos y 1400 productores, es coordinado por el veterinario Claudio A. Muñoz Cárdenas, bajo la dirección del Hidatidólogo doctor Guido Merino Rubilar del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

13.- CONCLUSIÓN

De las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas, **la vacunación es la más útil**. La incorporación de acciones directas de control en los ovinos, bovinos, llamas y caprinos, que prevengan la infección y disminuyan la oferta de quistes hidatídicos para los perros, abre nuevas perspectivas al control de la EQ, al posibilitar atacar al ciclo de la enfermedad hidatídica en un nuevo frente.

La vacuna contra EQ en el ganado, permitirá a los Programas de Control de la Hidatidosis **disminuir** el tiempo en controlar la enfermedad, al poder atacar el ciclo en un nuevo frente. Esto a su vez permitirá reducir la oferta de quistes hidatídicos disponibles para los hospedadores definitivos y por ende disminuir la biomasa parasitaria disponible para los hospedadores intermedios, **ayudando así a reducir el riesgo de enfermar de las personas**.

La vacuna contra EQ en el ganado, permitirá a los propietarios de ganado contar con una nueva herramienta, que, sumada a las hoy disponibles como el control de la faena, la desparasitación periódica de los perros y la educación sanitaria, para controlar la EQ de su establecimiento agropecuario.

14.- BIBLIOGRAFÍA

Dévé, F. 1927.- *Essai de Vaccination Anti chinococcique par de Sable Hydatique Tyndalise. Compt. rend. Soc. de biol., 97: 1130-1131*

Gemmell MA. *Immunological responses of the mammalian host against tape-worm infections IV. Especificidad de especie de embrión hexacanto en la protección de ovejas contra Echinococcus granulosus. Inmunología. 1966; 11: 325-33*

Gemmell MA, Soulsby EJ. *The development of acquired immunity to tapeworms and progress towards active immunization, with special reference to Echinococcus spp. . Bull World Health Organ 1968; 39 (1): 45-55.*

Heath DD, Parmeter SN, Osborn PJ, Lawrence SB. *Resistance to Echinococcus granulosus infection in lambs. J Parasitol. 1981 Dec;67(6):797-99.*

Lightowlers MW. *Infecciones por Echinococcus: Aspectos inmunobiológicos y de vacunación. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1994; 1-21.*

Lightowlers MW, Colebrook A.L., Gauci C.G., Gauci S.M., Kyngdon C.T., Monkhouse J.L., Vallejo Rodriguez C., Read A.J., Rolfe R.A., Sato C. *Vaccination against cestode parasites: anti-helminth*

vaccines that work and why. *Veterinary Parasitology* 115 (2003) 83-123

Heath DD, Koolaard J. *Serological monitoring of protection of sheep against Echinococcus granulosus induced by the EG95 vaccine. Parasite Immunol.* 2012 Jan;34(1):40-4.

Heath DD, Lawrence SB. *Antigenic polypeptides of Echinococcus granulosus oncospheres and definition of protective molecules. Parasite Immunol.* 1996 Jul;18(7):347-57.

Heath DD, Jensen O, Lightowlers MV. *Progress in control of hydatidosis using - a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Tropica.* 2003; 85 133-143

Larrieu E, Herrero E, Mujica G, Labanchi JL, Araya D, Grizmodo C, Calabro A, Talmon G, Ruesta G, Perez A, Gatti A, Santillán G, Cabrera M, Arezzo M, Seleiman M, Cavagión L, Cachau MG, Alvarez Rojas CA, Gino L, Gauci CG, Heath DD, Lamberti R, Lightowlers MW. *Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data.. Acta Trop.* 2013 Aug;127(2):143-51.

Larrieu E, Mujica G, Gauci CG, Vizcaychipi K, Seleiman M, Herrero E, Labanchi JL, Araya D, Sepúlveda L, Grizmodo C, Calabro A, Talmon G, Poggio TV, Crowley P, Cespedes G, Santillán G, García Cachau M, Lamberti R, Gino L, Donadeu M, Lightowlers MW *Pilot Field Trial of the EG95 Vaccine Against Ovine Cystic Echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact. PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Oct 30;9(10): e0004134. doi: 10.1371/journal.pntd.0004134. Collection 2015.

Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Heath DD. *Vaccination against hydatidosis using a defi-*

ned recombinant antigen. Parasite Immunol. 1996 Sep;18(9):457-62.

Lightowlers MW, Jensen O, Fernández E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, Jenkins DJ, Heath DD. *Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Internacional Journal for Parasitology.* 1999; 29: 531-534

Lightowlers MW, Flisser A, Gauci CG, Heath DD, Jensen O, Rolfe R. *Vaccination Against Cisticercosis and Hydatid Disease. Parasitology Today.* 2000; 179: 191-196

Osborn PJ, Heath DD *Immunisation of lambs against Echinococcus granulosus using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. Res Vet Sci.* 1982 Jul;33 (1):132-3.

Poggio TV, Jensen O, Mossello M, Iriarte J, Avila HG, Gertiser ML, Serafino JJ, Romero S, Echenique MA, Dominguez E, Barrios, Heath D. *Serology and longevity of immunity against Echinococcus granulosus in sheep and llama induced by an oil based eg95 vaccine. Parasite Immunol.* 2016 Apr 22. doi: 10.1111/pim.12325.

Turner EL, Dennis EW y Berberian DA. *The production of artificial immunity against hydatid disease in sheep. The Journal of Parasitology, 1937, Vol. 23, No. 1 ., pp. 43-61*

Vivallo Cuevas, Iris Olivia. Tesis doctoral: *Evaluación de la vacuna Eg95 contra hidatidosis en ovinos. Facultad de Veterinaria, Universidad de Concepción, Chile, 2004.-*

HIDATIDOSIS

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95

EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

CONTROL DE LA HIDATIDOSIS CON LA VACUNA RECOMBINANTE EG95

La incorporación de acciones directas de control en los ovinos, bovinos, llamas y caprinos, que prevengan la infección y disminuyan la oferta de quistes hidatídicos para los perros, abre nuevas perspectivas a los programas de control, al posibilitar atacar al ciclo de la enfermedad hidatídica en un nuevo frente, lo que va a permitir lograr un control sostenido de la enfermedad en el tiempo. De las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas, **la vacunación es sin duda la más útil.**

La vacuna contra Hidatidosis en los hospederos intermediarios, permitirá a los programas de control de la Hidatidosis **disminuir** el tiempo en controlar la enfermedad en su territorio, al poder atacar el ciclo de la enfermedad en un nuevo frente, esto a su vez permitirá reducir la oferta de quistes hidatídicos disponibles para los hospederos definitivos y por ende disminuir la biomasa parasitaria disponible para los hospederos intermediarios, ayudando así a **reducir el riesgo de enfermar de las personas.**

Los establecimientos agropecuarios contarán con una nueva alternativa, que, sumadas a las hoy disponibles, como el control de su faena, la desparasitación periódica de sus perros, la educación sanitaria de su familia y personal, para **controlar la hidatidosis** de su establecimiento.

Editor: Oscar JENSEN

Médico Veterinario, *Centro de Investigación en Zoonosis.*

Chacra 18, C.P. 9020, Sarmiento, Chubut, Argentina.

e-mail: hidatidosis@coopsar.com.ar

Tel - Fax +54 297 4896413

