

INMUNIDAD EN EL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO

E. granulosus infecta sus hospederos en formas diversas y con algunas variaciones en su ciclo vital. La variabilidad de hospederos 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 huésped intermediario son la oncosfera invasora, el quiste hidatídico maduro y los protoescolices liberados después de la rotura del quiste hidatídico.

Algunos aspectos generales de las características inmunobiológicas de la infección por cestodos taenidos en el huésped intermediario son comunes del grupo e incluyen los aspectos siguientes:

- a- La inmunidad interviene de modo fundamental en la regulación natural de la transmisión. Los sujetos infectados muestran inmunidad intensa contra la reinfección.
- b- Los anticuerpos en el calostro transfieren la protección de las hembras infectadas a sus crías. También puede transferirse la inmunidad a receptores no infectados por medio de sueros o anticuerpos purificados obtenidos de animales infectados.
- c- La vacunación con extractos parasitarios sin refinar genera niveles altísimos de protección contra las reinfecciones.
- d- El calostro, el suero de la madre o la transferencia de anticuerpos de los animales vacunados protege a los receptores contra nuevas infecciones.

Gran parte de la información inicial sobre la vacunación contra infecciones por cestodos y sus hospederos intermediarios ha sido producto de estudios detallados en que se utilizó *Taenia taeniaeformis*, y esta especie ha seguido usándose como un modelo útil para investigaciones sobre vacunación contra este grupo de parásitos.

La limitante principal de la aplicación práctica de las vacunas para controlar estas parasitosis, reside en el abastecimiento y disponibilidad de antígeno; y tal situación también ocurre con *E. granulosus*. La fuente más potente del antígeno para las vacunas es la oncosfera.

En 1989, en Nueva Zelandia, se produjo una vacuna a base de antígenos recombinantes, contra la infección por *Taenia ovis* en ovinos, y fue la primera vacuna muy satisfactoria obtenida con esta técnica contra una parasitosis.

LA VACUNA EN LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

La vacuna, debería permitir inmunizar a hospedadores intermediarios de corta edad mientras aún están protegidos por los anticuerpos que recibieron de sus madres, y mantener los niveles protectivos con un refuerzo anual, que será administrado, a las madres en los trabajos previos a la parición y al resto de los animales en su primera entrada a los corrales, luego del invierno. Los ensayos realizados indican que el procedimiento de elección, son dos dosis de vacuna con un mes de separación y luego un refuerzo anual.

Es necesario un nivel alto de anticuerpos para matar cualquier nueva oncosfera que invada el organismo. Si una nueva oncosfera invade el organismo y necesita estimular las células de memoria para producir anticuerpos, cuando estos estén disponibles, la oncosfera se transformará en quiste hidatídico y no será afectado. Los hospedadores intermediarios deben tener anticuerpos circulantes suficientes para matar la oncosfera cuando los animales pastan en los alrededores de los cascos de estancias, secciones y puestos; potreros, corrales y galpones; lugar donde se estima la mayor contaminación por materia fecal canina y huevos de *E. granulosus*.

LA VACUNA EXPERIMENTAL EG 95

La vacuna desarrollada por M.W. Lightowers, D.D.Heath y colaboradores, denominada EG95, es una proteína recombinante clonada a partir de RNAm obtenido de la oncosfera del parásito que, expresada como una proteína de fusión y aplicada junto con el adyuvante Quil A, protege frente a la infección por *E. granulosus* al inducir anticuerpos específicos contra la oncosfera del parásito. El parásito es eliminado cuando ocurre la infección, antes de poder establecerse en los tejidos del huésped. Es una preparación proteica purificada, no infecciosa, no tóxica, no contaminante, producida mediante ingeniería genética, expresada en *Escherichia coli*.)

Los ensayos establecieron que la cantidad de antígeno necesaria 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 persistencia más larga en 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 reacción locales y sistémicas. No se detectaron problemas al vacunar corderos entre 4 semanas y 8 semanas de edad y hembras en etapa de gestación. La vacuna se presenta liofilizada y es reconstituida antes de su aplicación, con la finalidad de prolongar su tiempo de almacenaje. Esta vacuna podrá incorporarse a otras vacunas clostridiales, bacterianas o antiparsitario, pero se perderá la capacidad de ser liofilizada.

ENSAYOS DE LA VACUNA EG95

El Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Melbourne, el Centro de Investigación Animal de Nueva Zelanda y el Departamento Zoonosis de la Secretaría de Salud de Chubut realizaron ensayos en estudios experimentales multicéntricos, controlados y aleatorizados en Australia, Nueva Zelanda, China y Argentina.

Los animales de los ensayos fueron “rumiantes menores” de menos de 25 semanas, no expuestos a la infección por *E. granulosus* y siguieron el calendario sanitario del establecimiento donde se realizó el ensayo. La vacuna liofilizada fue reconstituída una hora antes con agua destilada y aplicada en forma subcutánea en la tabla del cuello o la axila, a la dosis de 50 ug de la proteína EG95 y 1 mg de adyuvante Quil A, en un volumen de 2 ml.

Los corderos y/o chivos vacunados y testigos fueron desafiados por vía oral con aproximadamente 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.

RESULTADOS

Los resultados de todos los ensayos realizados en Australia, China, Nueva Zelanda y Argentina fueron similares con protección logradas en los animales vacunas respecto a los controles, entre 83% y 99%, para los ensayos con dos dosis de vacuna EG95.-

DURACION DE LA INMUNIDAD

Ensayos realizados en China y en Argentina con animales que recibieron dos 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 un ensayo realizado en Argentina con 3 dosis se logró una protección del 100%.

La tercera dosis logra un nivel más alto de anticuerpos y una mayor protección. Esta inmunidad podría mantenerse por un período prolongado.

NUMEROS DE DOSIS

En ensayos realizados en Argentina con una sola dosis y el desafío realizado a los 5 y 12 meses se logró una protección del 82 y 85 %. En ensayos realizados en Australia, Argentina, China y Nueva Zelanda con dos dosis se lograron

protecciones entre el 83% y 99%. Los ovinos que recibieron una tercera dosis un año después y fueron desafiados al mes fueron protegidos en un 100%.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN ARGENTINA

a.- Con Ovinos

El ensayo Chubut Nº 1, se inicia en mayo de 1995, con 20 corderos Merino. Diez fueron protegidos con dos dosis de vacuna EG95 con 4 semanas 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 quiste hidatídico. En el 100% de los animales testigos (10/10), se encontraron quiste hidatídico. Fueron detectados en total 232 quistes hidatídicos. En el grupo vacunado, un ovino (1/7), presentó un (1) quiste hidatídico viable, de 2 mm. La protección resultante fue del 99.4 %.

El ensayo Chubut Nº 2, se inicia en mayo de 1996, con 20 corderos Merinos, de 6 meses de edad, en un campo de 2.500 hectáreas. Diez fueron protegidos con tres dosis de vacuna EG95. Todos fueron desafiados. En el grupo testigo se encontró una media de 92 quiste hidatídico. En el grupo vacunado no se encontraron quistes. La protección resultante fue del 100%.-

El ensayo Chubut Nº 3, 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.

El ensayo Chubut Nº 4, se inició en mayo del 97, en un lote de 10 ovejas 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.

El ensayo Chubut Nº 5, se inicia en la primavera de 1.999 con ovejas 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 calostrada no interfirió con la respuesta de anticuerpos en los corderos vacunados.

b.- Con Caprinos

El ensayo Neuquén N° 6, se inició en mayo de 2001, con 40 chivos, raza Angora de 6 meses de edad, divididos en cuatro grupos, 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 de 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°.-

A la necropsia no se encontraron quiste hidatídico en los caprinos vacunados con dos dosis y se encontraron quiste hidatídico en el 15% de los caprinos con una dosis. 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.-

IMPORTANCIA DE LA VACUNA

La disponibilidad de una vacuna contra hidatidosis en rumiantes menores:

Permitirá a los Programas de hidatidosis disminuir el tiempo en controlar la enfermedad en su territorio, al poder atacar el ciclo de la enfermedad en un nuevo frente.

La vacuna les **permitirá** acentuar la reducción de la oferta de quistes hidatídicos disponibles para los hospederos definitivos, lo que implica reducir la biomasa parasitaria disponible para los hospederos intermediarios, ayudando así a disminuir el riesgo de enfermar de las personas.

Ofrecerá al productor ganadero una nueva alternativa, que deberá sumar a las hoy disponibles: como la desparasitación periódica de sus perros, la educación sanitaria de su personal y el control de su faena, para erradicar la hidatidosis de su establecimiento.

Será una herramienta adicional para que los países insulares y continentales afectados por las hidatidosis, inicien el camino hacia el control definitivo de la enfermedad.

ESQUEMA DE VACUNACIÓN PARA “RUMIANTES MENORES” EN ARGENTINA

Para determinar los esquemas de vacunación debemos tener en cuenta las áreas con bajo y alto riesgo de contraer hidatidosis, que están establecidas por los programas de control y el tipo de manejo que realiza cada establecimiento. Los establecimientos con pastoreo extensivo y traslado de las majadas a los potreros y corrales de los cascros, secciones y puestos solo para los trabajos de desoje, señalada, esquila y tratamiento sanitarios, deben tener un esquema diferente a los pequeños establecimientos, granjas y chacras donde se realiza encierre nocturno y/o donde los animales pastan en las cercanías de las casas, con un probable mayor riesgo de infección.

Para todos los rumiantes menores de Argentina en el inicio del esquema de vacunación se debe aplicar dos dosis a todos los animales. La primera en los trabajos previos a la parición y la segunda en la esquila y/o en el baño obligatorio.

En zonas de alto riesgo es necesario un refuerzo anual a todos los rumiantes en los trabajos previos a la parición. 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 bajo riesgo un refuerzo anual a las madres en los trabajos previos a la parición y en coincidencia con la segunda dosis a los corderos y chivitos en la esquila, es conveniente. Esto lograría proteger a los rumiantes menores que pastan en los potreros cercanos a los cascros y/o puestos, que generalmente son los animales de mayor valor tales como los planteles, reproductores y animales de consumo.

En las chacras, granjas y pequeños establecimientos, donde se practica el encierre nocturno y/o que los rumiantes menores pastan cerca de la casa, los animales deberían entrar a la primavera con alto nivel de anticuerpos y los corderos y chivitos deberían recibir la primera dosis a las 4 semanas.

En los sistemas de veranada-invernada todos los rumiantes menores deberán iniciar los arreos con un nivel alto de anticuerpos; con la segunda dosis y/o el refuerzo anual aplicado.

ANTECEDENTES DE LA VACUNA EG95

Algunos antecedentes cronológicos, sobre la investigación sobre la vacuna recombinante EG95

1.927.- El francés Félix Devé (1872-1951) Investiga la inmunidad causada por *E. granulosus* en el hospedero intermediario, con sus estudios en conejos, que no fueron exitosos.

1.937.- Edward Turner y sus colegas en la American University en Beirut, logran producir inmunidad en ovinos. *Journal of Parasitology* 23:41-61,

1.966.- Michael Gemmell realizó investigaciones en inmunidad relacionadas con el parásito. Review escrito junto a Lawson Soulsby, publicado en el Boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO).

1.970.- Tesis doctoral de David Heath de Nueva Zelanda. *The developmental biology of larval cyclophyllidean cestodes in mammals*. Thesis Doctor of Philosophy, Australian National University.-

1.981.- El Australiano Marshall Lightowlers inicia sus trabajos en inmunología de *T. taeniaeformis* en ratones, como paso previo a una posible vacuna contra *E. granulosus*

1.982.- Los Neozelandeces Osborn y Heath publican sobre la vacuna extractiva parasitaria. *Reserch Veterinaty Science*, 1982. 33, 132-133

1.990.- El Australiano Marshall Lightowlers realiza la primera publicación que contiene ideas acerca de la creación de una vacuna como EG95, en base a la vacuna contra *T. Ovis*. *Inmunology and molecular biology of Echinococcus infections*. *International Journal for Parasitología* Vol 20 N°4, pp. 4/ 471-478, 1990

1.993.- Heath y Lightowlers, presentan la vacuna recombinante EG95, en el Congress of Hydatidology, de Beijing,

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

1.996.- Lightowlers y col., publican sobre la primera vacuna recombinante contra Hidatidosis. *Vaccination against hydatidosis using a defined recobinant antigen*. *Parasite Inmunology*, 1996: 18: 457 - 462

1.995.- Se incorpora el Departamento Zoonosis, de la Secretaría de Salud, de la Provincia del Chubut Argentina, al grupo de Marshall Lightowlers de la

Universidad de Melbourne en Australia y al grupo de David Heath del Ag Research de Nueva Zelanda.

1.995 – 1.999 Se realizan ensayos experimentales bajo mismos protocolos, en Australia, Nueva Zelanda, China y Argentina.-

1.995.- En Junio se vacunó al primer cordero en Chubut, Argentina.

1.997.- Se incorpora el Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT), de la Facultad de Ciencias Naturales la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, con el grupo de la Dra. Paula Sanchez Thevenet.-

1.999.- Lightowlers, Jensen, Fernández, Iriarte, Woollard, Gauci, Jenkins y Heath publican: *Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep*. *International Journal for Parasitology*. 1999; 29: 531-534

1.999.- Se inicia la búsqueda de un laboratorio para la producción comercial.

2.000.- Lightowlers, Flisser, Gauci, Heath, Jensen y Rolfe, publican: *Vaccination Against Cisticercosis and Hydatid Disease*. *Parasitology Today*. 2000; 179: 191-196

2.001.- 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 desisten del proyecto por considerarlo “no rentable”.-

2.002.- En Mayo se iniciaron ensayos en la Provincia de Neuquén, con caprinos, que finalizaron en el 2003.

2.003.- Heath, Jensen y Lightowlers, publican el review: *“Progress in control of hydatidosis using vaccination of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes”* Heath, Jensen y Lightowlers. *Acta Tropica* 85 (2003) 133 /143

2.006.- El laboratorio de productos veterinarios Tecnovax 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.

2.007.- Inicio de ensayos a campo, utilizando la vacuna como medida de control, en ovinos y caprinos, en una colonia aborigen de Chubut, Argentina

2.008.- El laboratorio Argentino Tecnovax SA, de producción de vacunas veterinarias, firma un acuerdo comercial con el Ag Research de Nueva Zelandia y la Universidad de Melbourne, e inicia los trámites ante SENASA, para producir la vacuna EG95, en Argentina.

2.009.- La provincia de Río Negro inicia un ensayo de control con vacuna producida en la Universidad de Melbourne, de Australia.

2.009.- En un establecimiento de Península Valdez (Chubut) se inicia el monitoreo de la inmunidad que confiere la vacuna experimental EG95 y la futura vacuna comercial Hidatil EG95, en un lote de 50 ovinos

2.010.- El SENASA aprueba la producción comercial de la Vacuna, al laboratorio Tecnovax SA

BIBLIOGRAFÍA

1.- Jensen O, Fernández R, Gonzalo R, Fernández E, Iriarte J, Lago J. Perspectivas de los Programas de Hidatidosis a través del Control de la enfermedad en el Ovino. *Boletín de Hidatidosis de la Provincia del Chubut*. 1995; 3: 17-18.

2.- 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

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

4.- Richad MD y Williams JF. Hidatidosis/cisticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Advances in Parasitology*. 1982; 21: 229-296

5.- Johnson KS, *et al.* Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 1989; 338: 585-587

6.- 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

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

8.- Jensen O, Fernández E. Inmunización en el hospedador intermediario. Desarrollo de la vacuna recombinante EG95 En: Situación de la Hidatidosis-Echinococcosis en la República Argentina, Denegri GM, Elissondo MC, Dopchiz MC (Ed) Editorial Martín, Mar del Plata 2002; 51-55

9.- Jensen O, Fernandez R, Sánchez Thevenet P. Hidatidosis en la Patagonia Argentina En: La cría ovina en la Patagonia, Bulman M, Lamberti J (Ed.) Rivolin Hnos. Buenos Aires 2004; 75-84