Corresponde a Resolución Nº **033/10 C.D.**

Número de Proyecto: ….
Año: ……2009…….

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de CIENCIAS VETERINARIAS

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO:

EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA VACUNA Eg95 CONTRA LA HIDATIDOSIS OVINA EN UN ESTUDIO DE CAMPO

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: Salud Pública (1206-1212)

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: 1210.

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. ÁREAS:

Cátedra de Epidemiología y Salud Pública , Facultad Ciencias Veterinarias
Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias , Facultad Ciencias Veterinarias
Instituto de Zoonosis de la UNLPam

2.2. OTRAS INSTITUCIONES

Instituto Nacional de Microbiología “Anlis-Malbrán”
Ministerio de Salud, Provincia de Río Negro

2.3.EQUIPO de TRABAJO:

Apellido y Nombre y firma	Función	Cátedra / Institución	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Larrieu Edmundo	Director	Instituto de Zoonosis	20
Lamberti Roberto	Co Director	Cátedra Parasitología	20
Calvo, Claudio	Diseño y análisis técnico	Cátedra Parasitología	10
Gino, Lilia	Diseño y análisis técnico	Cátedra Parasitología	10
Perez, Alicia	Lab. Coproantigenos	Ministerio de Salud	20
Gatti, Antonio	Lab. serología	Ministerio de Salud	10
Mujica Guillermo	Campo, Lipetren	Ministerio de Salud	20
Herrero Eduardo	Campo, Anecon	Ministerio de Salud	20
Guillermo Ruesta	Campo, Nahuel Pan	Ministerio de Salud	20
Talmon Gabriel	Campo, Nahuel Pan	Ministerio de Salud	10
Cavagion Laura	Estadística	Cátedra Epidemiología	20
Garcia Cacheau Mariela	Estadística	Cátedra Epidemiología	20
Emiliano Alvarez	Análisis técnico	Cátedra Epidemiología	20
Cabrera Marta	Lab. PCR	Instituto Malbran	10
Guarnera Eduardo	Co Director	Instituto Malbran	10
Daniel Araya	Campo, Lipetrén	Ministerio de Salud	10
Jose Luis Labanchi	Campo, Blancura	Ministerio de Salud	10
Natalia Casas	Campo, Blancura	Ministerio de Salud	5
Gilda Bertorello Mascaró	Asistencia técnica	Cátedra de Parasitología	10

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: primera etapa

FECHA de INICIO: 01 / 01 /2010 FINALIZACIÓN: 31 / 12/ 2012

3. RESUMEN DEL PROYECTO:

Se evaluará la capacidad protectiva de la vacuna EG95 contra la equinococcosis ovina, en condiciones de campo, identificando el impacto que pueda producir en la infección en el perro y en disminuir la contaminación ambiental generada por el parásito. Para ello, se trabajará en 6 reservas indígenas de la provincia de Río Negro: Anecon Grande, Rio Chico abajo, Nahuel Pan, Blancura Centro, Mamuel Choique y Lipetren. Todos los productores se encuentran georeferenciados y la información recopilada es parte de un sistema de información (SIG) en arcview 3.2 (software de aplicación en el desarrollo de SIG). Mediante un muestreo aleatorizado y estadísticamente representativo en productores rurales afincados en reservas indígenas se establecerá la línea base de infección, mediante coproantígenos en materia fecal de perros y mediante PCR en muestras de tierra para evaluar contaminación ambiental, mediante bromhidrato de arecolina para medir la infección en perros y mediante serología (elisa) en ovinos de 2-4 dientes. En las reservas indígenas se aplicará un modelo de inmunización basado en 2 dosis de vacuna en corderos a la esquila y la señalada, de acuerdo al manejo que se aplique localmente en cada una de las reservas indígenas (estimativamente 30 días y un refuerzo al año siguiente, manteniéndose el mismo esquema durante 6 años (el proyecto de investigación se plantea a 3 años, esperándose poder avanzar en una segunda etapa). El área de trabajo se dividirá en área de vacunación (n= 2500 corderos) y área control (n= 2500 corderos) sin vacunación. Anualmente se evaluará el impacto en los distintos hospederos mediante estudios de coproantígenos en materia fecal de perros, PCR en suelo y serología en ovejas, mediante la metodología estadística explicitada en el protocolo específico (El análisis de los resultados o estudio de impacto, se efectuará con test de Chi cuadrado de asociación con un nivel de significación de $p < 0.05$, estimación del intervalo de confianza de Wolf y estimación de Odds ratio para cada una de las técnicas analíticas para medir prevalencia de la infección antes de la vacunación y al final de cada período de trabajo.

4. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

4.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS Y DESCRIPCIÓN DE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA

INTRODUCCION:

La equinococcosis quística o hidatidosis es una zoonosis parasitaria producida por un cestodo familia *Taenidae*, género *Echinococcus*, especie *granulosus*, descripto en 1786 (4,l4). Requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida. Un hospedero definitivo, (carnívoro, especialmente el perro) donde se desarrolla la faz adulta o estrobilar y un hospedero intermediario en donde se desarrolla la faz larvaria o metacestode (14).

Cuando huevos de *Echinococcus granulosus* son ingeridos por hospederos susceptibles (especialmente el ovino) llegan al estómago en donde sufren la disgregación del embriósfero y la activación de la oncósfera. Esta exhibe intrincados movimientos rítmicos del cuerpo y los ganchos y penetran a través de las microvellosidades intestinales pasando a los sistemas linfáticos y venosos para ir a instalarse definitivamente en alguna víscera, preferentemente hígado o pulmón.

La forma larval o metacestode que se desarrolla es típicamente unilocular, pleomórfica, llena de fluido y con una compleja estructura consistente en una membrana germinal interna, compuesta por células de núcleo circular u ovalado y una membrana cuticular, acelular y elástica (externa), rodeada por una membrana adventicia y fibrosa producida por el hospedador.

Existen diversidad de cepas de *Echinococcus granulosus*, algunas de las cuales se encuentran presente en Argentina: cepa ovina G1, cepa ovina tasmania G2, cepa vaca G5, cepa camello G6 y cepa porcina G7 (13) .

Es una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia en Argentina, Uruguay, Chile, Perú, el sur del Brasil, produciendo elevados costos para la ganadería en función del valor de las vísceras decomisadas y pérdidas en la producción de lana, leche y carne; y para los sistemas de salud en razón de los costos de internación y tratamiento de las personas (15).

DESCRIPCION DE LA SITUACION ACTUAL:

Las formas parasitarias que pueden desencadenar respuesta inmunitaria en el huésped intermediario son la oncósfera invasora, el quiste hidatídico maduro y los protoescólices liberados después de la rotura del quiste hidatídico (11).

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 (11).

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 (12).

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 (11).

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 (8).

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 (7,10).

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 desarrollada por MW Lightowlers y DD Heath, denominada EG95, es una proteína recombinante clonada a partir de ARN 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* (7).

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.

Se cuenta con información de estudios experimentales controlados en Australia, Nueva Zelandia, China y Argentina en rumiantes menores de menos de 25 semanas, no expuestos a la infección por *E. granulosus* con vacuna liofilizada 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. (2), siendo los animales vacunados y desafiados por vía oral con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infectados, siendo entre los 8 y 14 meses de producida la infección 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. (10)

Los resultados de todos los ensayos fueron similares con protección logradas en los animales vacunados respecto a los controles, entre 83% y 99%, para los ensayos con dos dosis de vacuna EG95. Otros ensayos 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% (7,10).

Sin embargo, la vacuna Eg95 no ha sido probada en condiciones de campo.

Hasta el momento, los programas de control basan su estrategia para cortar el ciclo de transmisión es la desparasitación con Praziquantel, lo cual ha permitido disminuir significativamente la prevalencia de la infección en el perro y en el hombre (4,5,9). Sin embargo, en 30 años de tareas no se ha logrado la eliminación del parásito. Incorporar una nueva estrategia de ataque, basada en evitar la infección en el ovino, y como consecuencia en el perro, podría permitir mayores éxitos en la disminución de la prevalencia o en la eliminación del parásito del ambiente.

4.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR LOS INTEGRANTES DEL PROYECTO DENTRO DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DEL MISMO

- Infection and reinfection rate by *Echinococcus granulosus* in rural dogs. Vet Parasitology, 87:281-286, 1999
- Evaluation of the losses produced by hydatidosis and cost/benefit analysis of different strategic interventions of control in the Province of Rio Negro. Bol Chilen Parasitol 55:8-13, 2000
- Hidatidosis en el Departamento Maraco. Bol Chilen Parasitol, 2000
- Portadores Asintomáticos de Hidatidosis: Epidemiología, diagnóstico y tratamiento. Rev Panam Salud Pub. 8:250-257, 2000
- Control program of hydatid disease in the Province of Río Negro, Argentina, 1980-1997. Bol Chilen Parasitol 55:49-53, 2000
- Epidemiological surveillance of human hydatidosis by means of ultrasonography: its contribution to the evaluation of control program. Acta Trópica, 79:219-223, 2001
- *Echinococcus granulosus* transmission dynamics in ovine of the province of Rio Negro, Argentina, 1980 – 1999. Vet Parasitol. 98:263-272, 2001
- Diagnosis of human hydatidosis: predictive value of the rural ultrasonographic survey in an apparently healthy population. Medicina, 60:466-468, 2000
- Human cystic echinococcosis: contribution to the natural history of the disease. Ann Trop Med Parasitol. 95:679-687, 2001
- Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. Vet. Parasitol. 88:131-134, 2000
- Risk factors for Hydatidosis in children of Río Negro Province, Argentina: A study of cases and controls. Ann Trop Med Parasitol. 96:43-52, 2002
- Ultrasonographic diagnosis and medical treatment of human cystic echinococcosis in asymptomatic school age carriers: 5 years of follow-up. Acta Tropica 91: 5-13, 2004
- Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. Vet. Parasitol. 128:73-81, 2005
- Equinococcisis ovina: respuesta inmune y fisiopatología de la infección en ovinos experimentalmente infectados. Rev Med Vet 87: 91-99, 2006
- Identification of Echinococcus granulosus eggs. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 44:29-34, 2002
- Diagnóstico inmunológico de la equinococcosis ovina. Ciencia Veterinaria 7:27-42
- Ovine echinococcosis I. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay. Vet Parasitol. 143:112-121, 2007

4.3. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DE LOS INTEGRANTES RELACIONADOS AL PROYECTO:

- Evaluación del impacto de un programa de control de la Hidatidosis en el huesped intermediario ovino, 1998. Financiación: Universidad Nacional de La Pampa.
- Relevamiento de la situación de la echinococcosis/hidatidosis en perros y ovinos de la República Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. 1999
- Diagnóstico de la situación de la echinococcosis canina en establecimientos ganaderos del sur de la Argentina. Proyecto VIGI+A– Banco Mundial. 2002.
- Evaluación de la respuesta inmune y diagnóstico de la equinococcosis ovina mediante un ensayo inmunoenzimático. Facultad Ciencias Veterinarias de la UNLPam. 2003
- Análisis de la respuesta inmune a la infeccion por *Echinococcus granulosus* en corderos experimentalmente infectados y respuesta al tratamiento con albendazol. Facultad Ciencias Veterinarias, 2006
- Análisis de la respuesta inmune humoral y celular a la infección por E*chinococcus granulosus* en ovinos experimentalmente infectados, Facultad Ciencias Veterinarias, 2009

5. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

5.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y RESULTADOS ESPERADOS DEL PROYECTO

La vacuna Eg95 ha sido probada experimentalmente demostrando alta eficacia. Las pruebas, desafío a animales previamente vacunados, en condiciones controladas. Sin embargo no ha sido probada en condiciones de campo, en donde factores como la capacidad de organización y la infraestructura para asegurar cobertura de vacunación suficiente, condiciones de mantenimiento de la vacuna liofilizada una vez que es reconstituida para su aplicación, su aplicación en condiciones de campo, movimientos de compra y venta de animales en las áreas bajo vacunación, mantenimiento de la capacidad protectiva en el tiempo en ovinos vacunados y otros factores locales tal como la amplitud entre cabeza y cola de parición que puede permitir que algunos ovinos pastoreen en áreas contaminadas antes de ser inmunizados, pueden modificar la capacidad potencial de la vacuna. Así, el uso de la vacuna en programas de control, en forma masiva, puede encontrar dificultades que no permitan expresar el potencial de la vacuna, resultando por ende en el mantenimiento del ciclo de la infección.

En función de ello, se propone utilizar la vacuna en condiciones de campo, no controladas, a los efectos de evaluar la capacidad de la vacuna EG95 en cortar efectivamente el ciclo de la enfermedad. Ello requiere organizar un esquema de vacunación y aplicarlo en algunas áreas rurales y mantener un grupo control sin vacunación y sostenerlo en el tiempo hasta la renovación de la majada ovina inicial. En ambos grupos serán medidas las prevalencias para ver diferencias al final del proceso. El resultado espero es ver la capacidad efectiva de la vacuna EG95 en modificar las prevalencias en los distintos hospederos

En relación a las técnicas para evaluar el impacto en los distintos hospederos y en el ambiente, serán en su mayor parte indirectos (sin observación directa del parásito).

La técnica de Elisa para el diagnóstico serológico en el ovino, desarrollada en trabajos previos y basada en el uso de antígenos totales, es una prueba diagnóstica sensible, específica y económica, que permite su aplicación en los programas de control (3) y permitirá monitorear el impacto de la vacuna, rápidamente, en animales jóvenes.

La evaluación de infección por identificación de coproantígenos en materia fecal de perro se encuentra estandarizada y en uso en la región (2,6), al igual que la técnica de PCR en muestras ambientales (ambas desarrolladas en el Instituto Malbrán). Presentan una elevada

especificidad y sensibilidad para evaluar la contaminación ambiental con restos parasitarios (1).

Actualmente, la vacuna EG95 no se encuentra disponible comercialmente en Argentina, aunque en laboratorio TECNOVAC se encuentra en fase de producción por lo que se encontraría disponible a partir de 2010. El laboratorio dueño de la patente, Universidad de Melbourne, proveerá las dosis necesarias para corroborar su poder protector en un estudio independiente.

HIPÓTESIS

1. La vacuna Eg95 aplicada anualmente en 2 dosis en corderos a la esquila y la señalada y con 1 refuerzo al año siguiente, permitirá disminuir la prevalencia de la infección por *Echinococcus granulosus* en los distintos hospedadores y en el ambiente

OBJETIVO

1. Evaluar la capacidad protectiva de la vacuna EG95 y los problemas operativos para su uso contra la infección por *E. granulosus* utilizándola en condiciones de campo

METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

PROTOCOLO 1: DIAGNOSTICO MEDIANTE COPROANTIGENOS

El conocimiento de la situación en el ambiente se determina por la demostración de la contaminación ambiental por *E. granulosus* mediante el diagnóstico del parásito o sus constituyentes o sus productos metabólicos en heces de perros emitidas espontáneamente, tanto recién emitidas como emitidas anteriormente y recogidas del ambiente y que viven en áreas con transmisión.

El diagnóstico en las heces se puede hacer por métodos inmunológicos, aplicando el Ensayo Inmuno enzimático- coproantígenos (ELISA-coproantígenos), utilizando westernblot como prueba de confirmación (2,6)

Los Procedimientos para la toma de muestras de heces caninas y su procesado incluyen:

a. Muestra: la unidad muestral es una porción de heces de canes que está dispersa en el suelo de una unidad epidemiológica.
b. Obtención de la muestra: la muestra puede ser indistintamente materia fecal recién emitida, líquida, sólida o semisólida, la cual deberá ser recogida evitando la contaminación excesiva con tierra, pastos u otros contaminantes del suelo. Si no hay heces frescas, se recogerán muestras sólidas emitidas en los días anteriores al día de la visita de recolección.
c. Volumen de la muestra: cuando se recogen heces frescas se toma el equivalente a dos cucharas soperas colmadas. Si se toman heces secas se recoge toda la deposición. En caso de que fuera muy voluminosa es necesario fraccionarla, tomando partes de diferentes sitios del conjunto.
d. Envase de la muestra: las muestras se recogen en envases plástico secos y limpios con tapa a rosca. No se adiciona ningún conservante.
e. Transporte de la muestra: las muestras se colectarán siempre individualmente. Todas las muestras se incluyen en una bolsa mayor que las contenga. La identificación de cada bolsa

debe ser completa. Para el transporte se coloca la bolsa en una caja de telgopor. Con el fin de cumplir con las normas de bioseguridad en el transporte de muestras, esta caja debe estar incluida dentro de otra de mayor tamaño, separadas por abundante papel absorbente. La última caja debe tener claramente identificada la parte de arriba y la indicación de no volcarla.
f. Las muestras deben ser enviadas inmediatamente al laboratorio de referencia junto con la documentación que la respalde.
g. Conservación de las muestras: si las muestras no pueden ser enviadas inmediatamente al laboratorio de referencia, se mantendrán en el laboratorio de origen refrigeradas a la menor temperatura disponible. Se pondrán en un freezer (una semana a -70ºC o dos semanas a -20ºC) afuera de las cajas de telgopor pero contenidas adentro de las bolsas que reúnen independientemente a cada unidad epidemiológica. Es importante considerar la correcta conservación de las muestras ya que el frío es crítico, puesto que evita o interrumpe la actividad enzimática de la materia fecal que degrada a los antígenos parasitarios.
h. Las muestras serán procesadas en el Laboratorio de Salud Ambiental de Bariloche, mediante ELISA y Westernblot, según técnicas descriptas (2). Alícuotas de las muestras negativas y todas las positivas se remitirán al Instituto Malbrán para control.

PROTOCOLO 2: DIAGNOSTICO MEDIANTE PCR

Los estudios ambientales se planifican para producir conocimiento acerca de la contaminación ambiental en las “unidades epidemiológicas” con el fin de asumir la situación del área que las contiene.

En el peridomicilio se establece el ciclo doméstico, dado que se verifica el contacto parasitario, entre los hospedadores definitivos y las vísceras de los hospedadores intermediarios faenados (ciclo animal), y entre los hospedadores definitivos parasitados y el ambiente (ciclo ambiental), el hombre es hospedador intermediario terminal del ciclo ambiental.

Así, la vivienda rural es a la vez el centro de generación de la endemia “unidad epidemiológica”, y el sitio para evaluar la contaminación del medio “observatorio de la EQ”.

El conocimiento de la contaminación de la “unidad epidemiológica” u observatorio de campo se hace por la demostración en el biotopo de secuencias de ADN mitocondrial específicas de *E. granulosus*. Los estudios se realizan sobre muestras de constituyentes naturales del peridomicilio, especialmente tierra superficial del patio, tomadas entre otros lugares del sitio donde suelen dormir los perros.

Los Procedimientos para la toma de muestras de heces caninas y su procesado incluyen:

a. Muestra: se considera que la unidad muestral es tierra del patio de las viviendas
b. Obtención de la muestra: las muestras de tierra se toman barriendo superficialmente el patio de las viviendas, una parte de la muestra se debe tomar del lugar donde duermen o descansan los perros.
c. Volumen de la muestra: se considera que la muestra de tierra debe ser de 300 g, por vivienda.
d. Condiciones de conservación: la tierra se conserva en estado natural, tal como se recogió.
e. Envase de la muestra: las muestras se recogen en bolsas de polietileno o frascos secos y limpios con tapa a rosca. El envase será individual para cada muestra pero incluidas en una bolsa mayor que reúne todas las muestras de una “unidad epidemiológica”.
f. Transporte de la muestra: las muestras se colectarán siempre individualmente, colocando cada una en una bolsa de polietileno. Todas las bolsas que se recolectan de la misma unidad

se incluyen en una bolsa mayor que las contenga (una bolsa final por vivienda). La identificación de cada bolsa debe ser completa.
Para el transporte se coloca la bolsa en una caja de telgoport con el fin de cumplir con las normas de bioseguridad en el transporte de muestras, esta caja debe estar incluida dentro de otra de mayor tamaño.
g. Las muestras serán procesadas mediante PCR en el Instituto Nacional de Microbiología "ANLIS-Malbran" según técnicas descriptas (1).

PROTOCOLO 3: DIAGNOSTICO EN OVINOS

En los animales vivos, de 2-4 dientes, se obtendrá 10 cc. de sangre de la vena yugular, de animales sujetados en posición de pie y con la cabeza fijada lateralmente, utilizándose agujas 25/8 y jeringas plásticas descartables.

Se seleccionarán aleatoriamente los ovinos de cada reserva para la toma de muestras de sangre, registrándose el origen de los animales (origen en la reserva o adquiridos en otro lugar), la fecha de obtención y la identificación del propietario.

Las muestras serán tomadas en el momento de la esquila o en encierres específicos, según disponibilidad de cada reserva.

El suero se extraerá mediante centrifugación, se conservará refrigerado a 5º - 8º hasta su remisión a laboratorio (48 hs máximo) en donde se mantendrá en freezer a –20º hasta su procesado.

Las muestras serán procesadas mediante enzimoinmunoensayo, según técnicas descriptas, en el Laboratorio de Salud Ambiental de Viedma (3). Alícuotas de las muestras positivas se remitirán al Instituto Malbrán para control.

Se necropsiarán 40 capones de 6 años para estudios histopatológicos en sala de faena

PROTOCOLO 4: VACUNACIÓN OVINA

Se utilizará la vacuna recombinante EG95, elaborada por la Universidad de Melbourne, la cual se provee en forma liofilizada en frascos de 50 dosis (7,10).

La vacuna liofilizada será reconstituía 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 (2).

Se aplicarán 2 dosis a los corderos. La primera dosis estimativamente se aplicará en:
Anecón grande (esquila posparto): en la esquila, estimativamente 5 de enero
Rio Chico – Mamuel Choique (esquila preparto), a la señalada (estimativamente 15 de diciembre)

Los corderos recibirán la segunda dosis a los 30 días (a la señalada en el caso de anecón grande, estimativamente 5 de febrero y encierre especial en el otro caso estimativamente 10 de enero).

Los corderos recibirán una dosis de refuerzo un año después, durante los trabajos de esquila (refuerzo al primer año).

La vacuna se aplicara en la entrepierna

PROTOCOLO 5: AREA DE TRABAJO, MUESTRA Y PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS

Las tareas se efectuarán en la Provincia de Río Negro, en las siguientes reservas de población originaria (mapas 1 y 2) :

Rinconada Nahuel Pan, El Bolsón, 25 familias, 280 ovinos, 100 corderos
Anecón Grande, Comallo, 20 familias, 3000 ovinos, 700 corderos

Rio Chico abajo, Ñorquinco, 30 familias, 2000 ovinos, 700 corderos
Mamuel Choique abajo: 22 familias, 3000 ovinos, 1000 corderos
Lipetren grande: 30 familias, 2500 ovinos, 1500 corderos
Blancura Centro, El Cuy: 20 familias, 5000 ovinos, 1000 corderos

N: 2500 corderos ingresaran a protocolo de vacunación y 2500 corderos como controles sin vacunar.

En el área de trabajo se efectúan desde 1980 actividades regulares de desparasitación canina y educación sanitaria, las que se mantendrán sin modificaciones, asegurando el registro del censo canino y de perros desparasitados.

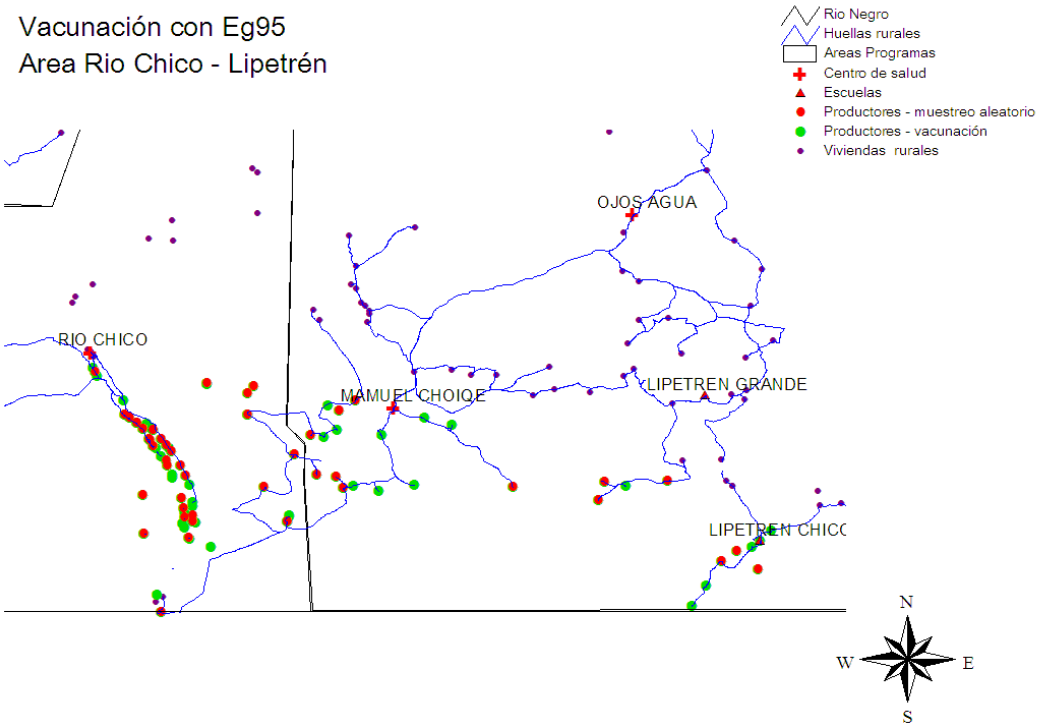
Las unidades a muestrearse se seleccionarán aleatoriamente en cada estudio (base e impacto); el tamaño de la muestra se estima con una prevalencia esperada del 20%, margen de error del 20% y nivel de confianza del 95% para el primer estudio y con una prevalencia esperada del 5% en el estudio final. La aleatorización y las estimaciones se efectuarán con EPIDAT 3.0.

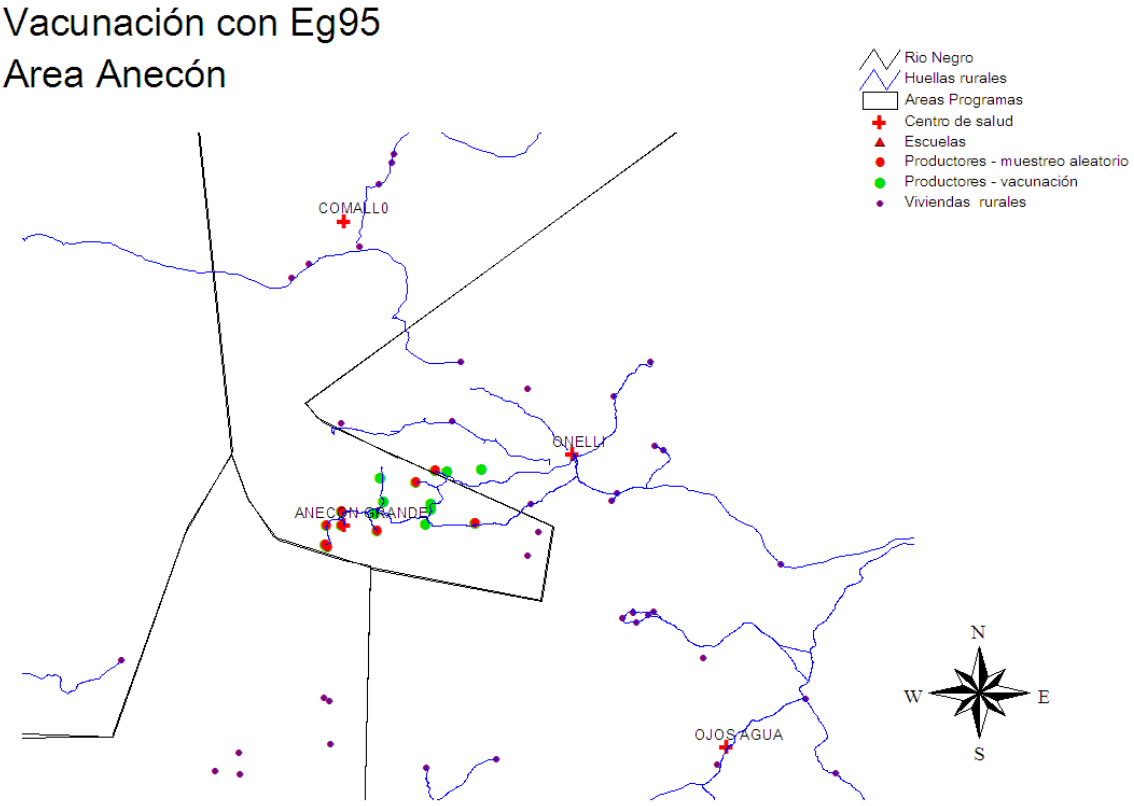
El número de estudios serológicos en ovinos se define asimismo por similar muestreo aleatorizado y con similares estimaciones de prevalencia y precisión.

Todas las unidades epidemiológicas se encuentran georeferenciadas e incorporadas a un sistema de información geográfico (SIG) en arcview 3.1.

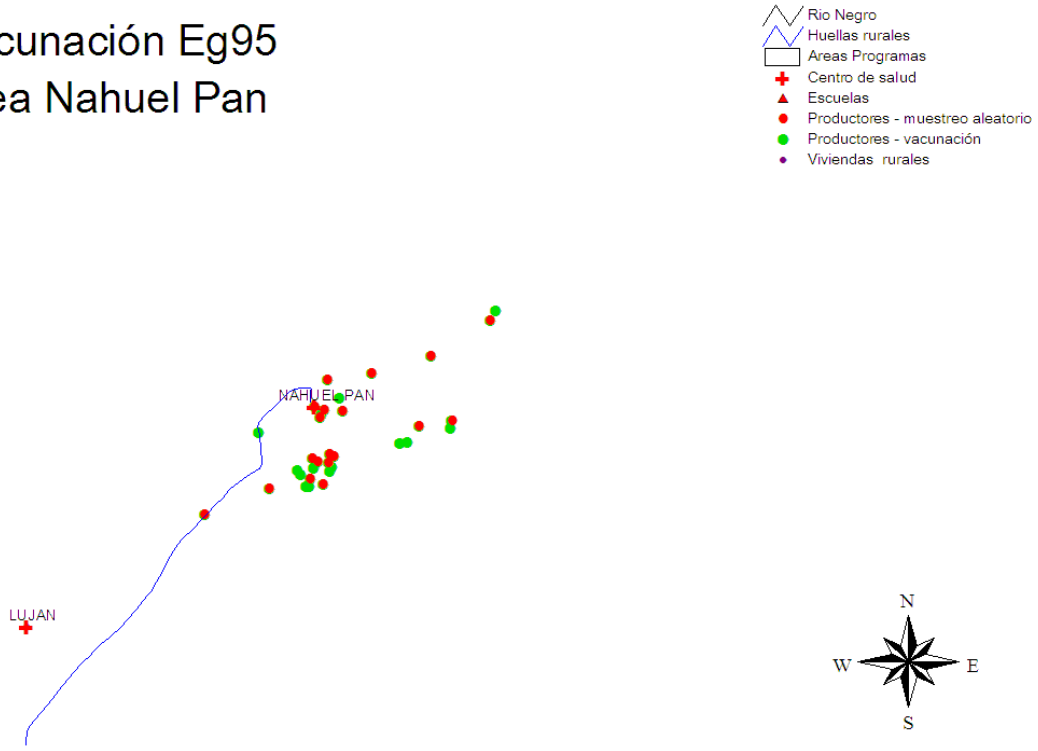
El análisis de los resultados (estudio de impacto) se efectuará con test de Chi cuadrado de asociación con un nivel de significación de $p < 0.05$, estimación del intervalo de confianza de Wolf y estimación de Odds ratio para cada una de las técnicas analíticas para medir prevalencia de la infección antes de la vacunación y al final de cada período de trabajo.

Mapas 1 a 3: Area de trabajo


Vacunación con Eg95
Area Rio Chico - Lipetrén
Rio Negro
Huellas rurales
Areas Programas
Centro de salud
Escuelas
Productores - muestreo aleatorio
Productores - vacunación
Viviendas rurales
OJOS AGUA
RIO CHICO
MAMUEL CHOIQE
LIPETREN GRANDE
LIPETREN CHICC
N
W
E
S


Vacunación con Eg95
Area Anecón
Rio Negro
Huellas rurales
Areas Programas
Centro de salud
Escuelas
Productores - muestreo aleatorio
Productores - vacunación
Viviendas rurales
COMALLO
ONELLI
ANECON GRANDE
OJOS AGUA
N
W
E
S

Vacunación Eg95
Area Nahuel Pan



5.2.CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO Y/O TECNOLÓGICO Y A LA RESOLUCIÓN DE LOS PROBLEMAS

Los programas modernos de control de la equinococcosis quística requieren de la ejecución de estudios epidemiológicos de base sobre las cuales medir el impacto de las actividades desarrolladas para cortar el ciclo de transmisión. En la presente experiencia se aplicarán técnicas modernas, actualmente disponibles, que permitirán medir el impacto de la vacuna en forma sensible y específica.

Se espera corroborar la capacidad protectiva de la vacuna EG95, utilizada hasta el momento solo en modelos experimentales, en un programa de campo con 30 años de desarrollo y en donde se mantienen niveles endémicos de transmisión.

Su aplicación podría permitir disminuir el tiempo en controlar la enfermedad, al poder atacar el ciclo de la enfermedad en un nuevo frente, acentuando la reducción de la oferta de quistes hidatídicos disponibles para los hospederos definitivos, ayudando así a disminuir el riesgo de enfermar de las personas.

5.3. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

- Primer año: definición de la línea base mediante estudios en materia fecal y suelo y en sangre de ovinos. Aplicación de la vacunación a la primer cohorte de corderos
- Segundo año: aplicación de la vacuna en las nuevas cohortes de corderos
- Tercer año: aplicación de la vacuna en corderos. Estudio de impacto en materia fecal, suelo y sangre. Análisis de resultados. Planteo de segunda etapa para continuar medición de impacto hasta el año 6.

6. INFRAESTRUCTURA Y PRESUPUESTO

6.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS Y OTROS BIENES REQUERIDOS POR EL PROYECTO YA EXISTENTES EN ESTA INSTITUCIÓN:

- Infraestructura de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias

6.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS Y OTROS BIENES NECESARIOS PARA EL PROYECTO Y NO DISPONIBLES EN ESTA FACULTAD

- Laboratorios de Salud Ambiental de Viedma y Bariloche
- Laboratorios de Anlis-Malbran

6.3. JUSTIFICACIÓN DE LA ADQUISICIÓN O FACTIBILIDAD DE ACCESO EN CONDICIONES DE PRESTAMO O USO DE LOS BIENES NO EXISTENTES EN ESTA INSTITUCIÓN

6.4. ESPECIFICAR OTRAS FUENTES DE FINANCIACIÓN:

- Programa de control de la hidatidosis de la Provincia de Río Negro

6.5. PRESUPUESTO ESTIMADO PARA EL PROYECTO PRESENTADO (TOTAL Y ANUAL) *

- Material de Vidrio, Caravanas, Pipetas, Jeringas, Agujas $ 4000.
- Bibliografía $ 1000.
- Viáticos, pasajes y combustibles (asistencia a congresos, tareas de campo) $ 6000
- Adquisición de capones para estudios de necropsia $ 8000

Total …… $ 19000

Año 1: $ 10000
Año 2: $ 4000
Año 3: $ 5000

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabrera M, Canova S, Rosenzvit M, Guarnera E. 2002. Identification of Echinococcus granulosus eggs. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 44:29-34
2. Cavagion L, Perez A, Santillan G, Zanini F, Jensen O, Saldia L, Diaz M, Cantoni G, Herrero E, Costa MT, Volpe M, Araya D, Alvarez Rubianes N, Aguado C, Meglia G, Guarnera E, Larrieu E. 2005. Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. Vet. Parasitol. 128:73-81
3. Gatti A, Alvarez R, Araya D, Herrero E., Costa M, Mancini S, Santillan G, Larrieu E. 2007. Ovine Echinococcosis: I. Immunological Diagnosis by Enzyme Immuno Assay. Vet Parasitol 117:112-121
4. Gemmel M, Lawson J. 1986. Epidemiology and control of hydatid disease. In: The biology of Echinococcus granulosus and hydatid disease (Thompson, R; Lymbery, J.) 189-216 George Allen and Unwin. London
5. Gemmel M, Roberts M, Beard T, Campano Diaz S, Lawson J, Nonnemaker J. 2001. Control of Echinococcosis. In: Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern. (Eckert, J.; Gemmel, M.; Meslin, F.; Pawlowski, Z) 195-203 WHO/OIE. France
6. Guarnera E, Santillan G, Botinelli R, Franco A. 2000. Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. Vet. Parasitol. 88:131-134
7. Heath D, Jensen O, Lightowlers M. 2003. Progress in control of hydatidosis using vaccination – a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Tropica 85:133-143
8. Johonson KS. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 338: 585-587
9. Larrieu E, Costa M, Cantoni G, Labanchi J, Bigatti R, Perez A. 2000; Control program of hydatid disease in the Province of Río Negro, Argentina, 1980-1997. Bol Chilen Parasitol 55: 49-53
10. Lightowlers M, Jensen O, Fernandez E, Iriarte J, Wollard D, Gauci C, Jenkins D, Heath D. 1999. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int. J. Parasitol. 29:531-534
11. Lightowlers MW. 1994. Infecciones por *Echinococcus*: Aspectos inmunobiológicos y de vacunación. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1-21.
12. Richad MD, Williams JF. 1982. Hidatidosis/cisticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. Advances in Parasitology 21: 229-296
13. Rosenzvit M, Zhang L, Kamenetzky L, Canova S, Guarnera E, Mcmanus D. 1999, Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. Parasitology 118:523-530
14. Thompson R, Mcmanus D. 2001. Aetiology: parasites and life cycles. In: Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern. (Eckert, J.; Gemmel, M.; Meslin, F.; Pawlowski, Z) 1-19 WHO/OIE. France
15. Torgerson P, Williams D, Aboshehada M. 1998. Modeelling the prevalence of echinococcus and taenia species in small rumiants of different ages in northern Jordan. Vet Parasitol 79:35-51