Corresponde a Resolución Nº **164/2008**

Número de Proyecto: ….
Año: ……2008…….

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de CIENCIAS VETERINARIAS

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO:

ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR A LA INFECCION POR *Echinococcus granulosus* EN OVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada – Desarrollo experimental

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
Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias
Cátedra de Inmunología
Cátedra de Patología General y Anatomía Patológica
Instituto de Zoonosis

2.2. OTRAS INSTITUCIONES

Ministerio de Salud, Provincia de Río Negro

2.3.EQUIPO de TRABAJO:

Apellido y Nombre	Función	Cátedra / Institución	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Larrieu Edmundo	Director	Instituto de Zoonosis	20
Lamberti Roberto	Investigador	Cátedra Parasitología	20
Meglia Guillermo	Investigador	Cátedra Parasitología	20
Calvo, Claudio	Investigador	Cátedra Parasitología	20
Gino, Lilia	Investigador	Cátedra Patología Gral	10
Véspoli Pucheu Verónica	Investigador	Cátedra Patología Gral	10
Alvarez Angela Rosa	Investigador	Cátedra Patología Gral.	20
Gatti Antonio	Investigador	Ministerio de Salud	5
Cavagion Laura	Investigador	Cátedra Epidemiología y SP	20
Alvarez Emiliano	Investigador	Cátedra Epidemiología y S P	15
García Cachau Mariela	Investigador	Cátedra Epidemiología y S P	20
Maisterra Virginia	Investigador	Cátedra Epidemiología y S P	8
Berterello Mascaró Gilda	Investigador	Cátedra de Parasitología	8
Miranda Ariel	Investigador	Cátedra de Epidemiología y SP	2
Cristian Herrero	Becario alumno	Cátedra de Epidemiología y SP	2
Horacio Diaz	Becario alumno	Cátedra de Epidemiología y SP	2

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO:

FECHA de INICIO: 01 / 07 /2008 FINALIZACIÓN: 31 / 07/ 2010

4. RESUMEN DEL PROYECTO:

En el ovino, la información sobre respuesta inmune a la infección por *Echinococus granulosus* y sobre las posibilidades del diagnóstico inmunológico y su uso en sistemas de vigilancia es muy limitada. Las revisiones científicas plantean limitaciones al uso epidemiológico de las técnicas inmunodiagnósticas, fundamentalmente por reacciones cruzadas con otras tenias. Las investigaciones en el área, sin embargo, son escasas y antiguas.

La tecnología desarrollada en anteriores investigaciones han permitido contar con técnicas sensibles, específicas y económicas para el diagnóstico de la equinococcosis quística en ovinos natural y experimentalmente infectados, tanto para su aplicación en programas de control como en investigación para estudios sobre respuesta inmune del ovino a la infección por *Echinococcus granulosus*

Las hipótesis del trabajo suponen a) que la respuesta inmune a la infección en ovinos experimentalmente infectados es sostenida en el tiempo y puede ser correlacionada con la evolución de las imágenes quísticas detectables mediante ultrasonografía; b) que en ovinos con echinococcosis la capacidad de respuesta inmune celular se encuentra limitada en relación a ovinos sanos; c) que ovinos inmunizados con vacuna EG95 son protegidos contra la infección experimental por Echinococcus granulosus pudiendo evaluarse mediante serología la evolución de la respuesta inmune.

Los objetivos incluyen determinar la duración de La respuesta inmune luego de la infección por *Echinococcus granulosus*, correlacionar la respuesta inmune con el tipo de imagen ecográfica y evaluar la respuesta inmune celular en ovinos con y sin infección por *E. granulosus.* Para ello, se procederá en ovinos inoculados experimentalmente con huevos de *E. granulosus* a mantener la evaluación de la respuesta inmune en forma bimensual durante 3 años (completando así un seguimiento de 6 años) manteniendo controles trimestrales ecográficos para evaluar crecimiento de quistes hidatídicos. Se aplicarán inmunógenos a animales infectados y a animales sanos para evaluar respuesta inmune celular. Se aplicarán vacunas EG95 a corderos para evaluar protección contra una posterior infección experimental y la respuesta inmune a la vacuna.

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. 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. (Gemmel y col, 1986; Thompson y col, 2001). 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. (Thompson, 2001)

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. (Thompson, 2001)

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. (Eckert y col, 2001)

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. (Rosenzvit y col, 1999)

Es una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia en Argentina, Uruguay, Chile, Peru, 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. (Larrieu y col, 2000b; Torgerson y col, 2000)

DESCRIPCION DE LA SITUACION ACTUAL:

En presencia de un quiste hidatídico, la respuesta inmunitaria en los hospederos intermediarios está dada por el líquido hidatídico, principal factor responsable de la estimulación antigénica. Por el contrario, la capa laminar del quiste hidatídico, acelular y no degradable no estimula el sistema inmunitario del huésped, aunque se comporta como un filtro que permite el paso de macromoléculas. Por su parte, el tegumento de la capa germinativa actúa como barrera que impide el contacto de los antígenos del líquido hidatídico con las células inmunocompetentes del huésped.

Es necesario que en la capa germinativa ocurran alteraciones como microfisuras, complicaciones o roturas que modifiquen sus condiciones de permeabilidad para que la estimulación antigénica se produzca y pueda ser detectada por métodos inmunológicos.

Por las características ya mencionadas, los quistes de localización pulmonar tienen menos posibilidades de adquirir microfisuras en la pared por lo que los quistes pulmonares dan resultados preponderantemente negativos a las pruebas serológicas usuales. En los quistes hepáticos hay más posibilidades de microfisuras y complicaciones y, así también, de resultados serológicos positivos. Por su parte, los quistes pequeños y hialinos de cualquier localización tienen una baja posibilidad de salida de inmunógenos y por lo general dan resultados negativos. (Coltorti, 1975; Coltorti y col, 1978)

La actividad de la oncósfera en su ingreso al organismo, sin embargo, genera una primer respuesta inmune que puede ser detectada en los 30 días posteriores a su ingreso al organismo (Larrieu y col, 2005).

No se encuentra específicamente determinado la continuidad de esta respuesta inmune y su eventual desaparición y/o reemplazo por la respuesta generada por la salida de inmunógenos del líquido hidatídico.

En el inmunodiagnóstico de la hidatidosis pueden emplearse antígenos crudos o semipurificados de *Echinococcus granulosus* obtenidos de líquido hidatídico o protoescólices o también pueden emplearse alguno de los dos principales antígenos presentes en el líquido: antígeno 5 (termolábil) y antígeno B (termoestable). Ambos antígenos son lipoproteínas compuestos de diversas subunidades (52kDa – 67 kDa en antígeno 5; 8-12, 16 y 24 kDa en antígeno B). (Siracusano y col, 1997; Larrieu y col, 2005)

En el hombre, se ha demostrado que antígeno B es mas especifico que antígeno 5 para el inmunodiagnóstico de *Echinococcus granulosus*. Antígeno 5 presenta reacciones cruzadas con varios nematodes y cestodes, mientras que antígeno B solo se encuentra *en Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*. (Ortona y col, 1995; Siracusano y col, 1997).).

En el ovino, por su parte, la información es limitada. Las revisiones científicas (Lightowlers y col, 1986; Craig, 1993; Eckert y col, 2001) han planteado limitaciones al uso epidemiológico de las técnicas inmunodiagnósticas, fundamentalmente por reacciones cruzadas con otras tenias (Rodrígeuz y col, 1999). Las investigaciones en el área, sin embargo, son escasas (Eckert y col, 2001).

En 1980 se intentó el uso de DD5, HAI e inmunoelectrophoresis utilizándose antígenos totales y, en el caso de la DD5, antisueros control antiantígeno 5, resultando esta última técnica la más sensible y específica en un ensayo efectuado con un escaso número de animales experimentalmente infectados.

En los últimos años se ha mejorado la eficiencia diagnóstica, tanto con el uso de antígeno B como con antígenos totales. Elisa, Inmunoblot y HAI han sido utilizados con éxito (Lightowlers y col, 1989; Moro y col, 1997; Kitelberger y col, 1999; Gatti y col, 2005).

Elisa empleando como antígeno al liquido total (LTH) resulta actualmente la prueba de elección para el diagnostico serológico en ovinos pudiendo ser aplicados en programas de vigilancia epidemiológica y para identificar transmisión reciente expresada como infección en animales jóvenes. Western blot puede ser utilizada como prueba de confirmación. (Gatti y col, 2007)

La respuesta inmune en el ovino a la infección por *Echinococcus granulosus* ha sido escasamente estudiada. En tal sentido, se ha determinado en ovejas experimentalmente infectadas que la detección de anticuerpos antiantígeno 5 comenzó a los 120 días post infección. Antígeno 5 ha sido detectado mediante inmunoelectroforesis en quistes hidatídicos y *Cisticercos tenuícollis* de ovinos. (Conder y col, 1980; Varela Diaz y col,1977; Lightowlers y col, 1989). Utilizando Elisa en ovinos adultos se detectó respuesta inmune en los 30 días posteriores a la infección (Larrieu y colo, 2006).

En relación a la respuesta inmune celular, no se ha publicado información en relación a hidatidosis.

Una vacuna experimental recombinante obtenida de oncósferas del parásito, denominada EG95, ha sido desarrollada, protegiendo a los ovinos contra primoinfecciones e infecciones repetitivas por *Echinococcus granulosus*, alcanzando con una dosis una protección del 82%, con dos 97% y con tres 100%. Podría ser aplicada a corderos que aún tengan inmunidad calostral, requiriéndose de revacunaciones anuales para mantener la inmunidad. (Lightowers y col, 1999; Heath y col, 2003)

El tratamiento tradicional de la equinococcosis en el hombre es quirúrgico, aunque en los últimos años se dispone de alternativas menos invasivas, especialmente quimioterapia con albendazol. (Larrieu y col, 2000a, 2004; Del Carpio y col, 2000). La droga es efectiva en la eliminación del parásito, disminuyendo además el número de reinfecciones en personas tratadas en relación a las tratadas con cirugía, lo cual podría estar ligado al efecto del albendazol sobre oncósferas latentes. (Larrieu y col, 2005)

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR EL(LOS) INTEGRANTE(S) 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
- 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 in cattle farms in the south of Argentina: areas with a control program. *Vet Parasitol*, 2004
- Equinococcisis ovina: respuesta inmune y fisiopatología de la infección en ovinos experimentalmente infectados. Rev Med Vet 87: 91-99, 2006
- 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

5.3. 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 U. N. de La Pampa. 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 U. N. de La Pampa. 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

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

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

Para la determinación de la tasa de infección equinococcosica en el ovino **sólo** se ha utilizado el análisis macrocópico en sala de faena (Torgerson y col, 1998, Lahamar y col, 1999; Dueger y col, 2001; Ruiz y col, 1994; Cabrera y col, 1995; Gemmel y col, 2001; Larrieu y col, 2001a).

Este sistema presenta importantes limitaciones dada por las dificultades para obtener información de todas las categorías de edad (por ejemplo escasa faena de borregos), dificultades para obtener información del lugar de origen de los animales faenados (por ejemplo por faena concentrada en mataderos extrajuridiccionales), limitaciones en la sensibilidad y especificidad del método (86% y 95% respectivamente, con un valor predictivo positivo de sólo el 62%, determinados con la utilización de veterinarios especialmente entrenados para el diagnóstico de la hidatidosis en salas de faena y que encontraron dificultades diagnósticas en corderos y en quistes complicados de animales viejos), y limitaciones por la falta de representatividad de los animales faenados en relación a la población ovina existente en el área bajo control. (Larrieu y col 2001a)

Como alternativa se ha planteado el uso de la ultrasonografía (Maxson y col, 1996; Guarnera y col, 2001) aunque este método presenta limitaciones operativas y de equipamiento para su uso sistemático.

La técnica de Elisa desarrollada en trabajos previos, lograda con el uso de antígenos totales resultó una prueba diagnóstica sensible, específica y económica, que permite su aplicación en los programas de control (Gatti y col, 2007; Larrieu y col, 2007).

Asimismo, se aportó información sobre la respuesta inmune de ovinos adultos a la infección por *Echinococcus granulosus.* Se identificaron quistes fértiles a los 10 meses posteriores a la inoculación y oncosferas vivas hasta los 500 días. Se pudo observar que la respuesta de anticuerpos en el ovino a la infección por *Echinococcus granulosus* es anterior a la formación de líquido hidatídico y resulta de la presencia de la oncosfera. (Larrieu y col, 2006; Gatti y col, 2007)

La detección de la presencia de oncosferas vivas en el hígado aportó fuerte información sobre la patogenia de la enfermedad y resulta de utilidad para comprender la frecuencia de re operaciones en el hombre luego de la extirpación de un quiste hidatidico. (Larrieu y col, 2007)

Nuevos estudios longitudinales serológicos en ovinos jóvenes experimentalmente infectados se efectúan actualmente (Larrieu y col, no publicado) para clarificar la duración de la respuesta inmune dada por la oncósfera infectante en la primo infección y la aparición de la respuesta de anticuerpos dada por la salida de inmunógenos del líquido hidatídico de metacestodes formados.

También nuevos estudios mediante ultrasonografía en ovinos jóvenes experimentalmente infectados son actualmente desarrollados para clarificar aspectos de la aparición y crecimiento del metacestode y de los tipos de imágenes característicos de cada uno de esos estadíos.

En ambos casos, el seguimiento durante tres años no ha resultado suficiente para dilucidar los aspectos citados. Asimismo, resulta de interés evaluar las modificaciones posibles en la capacidad de respuesta inmune celular en ovinos con equinococcosis en relación a ovinos sin equinococcosis.

Actualmente, la vacuna EG95 no se encuentra disponible comercialmente en Argentina, aunque en un laboratorio se encuentra en fase de producción por lo que se encontraría disponible a partir de 2008, resultando de interés corroborar su poder protector en un estudio doble ciego independiente de los dueños de la patente.

HIPÓTESIS

1. La respuesta antigénica en corderos experimentalmente infectados se mantendrá durante 5 años posteriores a la inoculación de huevos de *Echinococcus granulosus*

2. Imágenes ultrasonográficas hipoecoicas compatibles con equinococcosis serán observadas en el tercer año posterior a la inoculación, observándose modificaciones en tamaño y tipo de quiste compatibles con envejecimiento del parásito en los tres años posteriores.

3. La respuesta inmune celular se encuentra disminuida en ovinos con equinococcosis

4. La vacuna EG95 protege en un 95% a ovinos con inmunidad calostral con dos dosis aplicadas en los primeros 60 días de vida.

.

OBJETIVOS

1. Determinar la curva de respuesta antigénica en corderos experimentalmente infectados con *Echinococcus granulosus* a diferentes dosis de inóculo durante un período de 6 años.

2. Determinar la secuencia de aparición de imágenes ultrasonográficas compatibles con equinococcosis luego de la infección en u período de 6 años.

3. Evaluar la respuesta inmune celular en ovinos con equinococcosis experimental

4. Evaluar la capacidad protectiva de la vacuna EG95

METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

PROTOCOLO 1: DIAGNOSTICO INMUNOLÓGICO

Para la prueba de enzimo inmuno ensayo con antígeno LHT (EIE.LHT) cada vial de antígeno se reconstituirá con el volumen adecuado de buffer de sensibilización (carbonato/bicarbonato, ph 9.6) a concentración de proteínas óptima, determinado por el método de Bradford (1976).

Las placas (micro strips) se sensibilizan utilizando una concentración de antígeno de 1 microgramo/pocillo. En cada pocillo se siembran 50 microlitros de antígeno diluido. Se mantienen 18 horas en cámara húmeda y se lavan 3 veces, 4 minutos cada vez con buffer de lavado (P.B.S. Tween 0.3%).

Se agrega a cada pocillo 100 microlitros del suero diluido 1/800 en PBS-Leche 3%-Tween 0.3% y se dejó 45 minutos a 37º. Se aspira el contenido y se lava con buffer de lavado 3 veces. Se siembran 100 microlitros de conjugado antigamaglobulina ovina marcada con peroxidasa diluida 1/2500 en solución PBS-Leche 3% - Tween 0.3%. Se incuban 45 minutos a 37º. Se aspira el contenido y se lava con buffer de lavado tres veces.

Como substrato revelador se utilizan 100 microlitros de ABTS en solución líquida (Sigma MR). Se incuban 45 minutos a 37ª y se agregan 100 microlitros de solución de frenado (SDS 1%).

Como testigo positivo se utiliza suero ovino con hidatidosis confirmado por histología. Como testigo negativo se utiliza suero ovino sin hidatidosis, cisticercosis y teniasis intestinal. Se define la dilución óptima de los sueros testigos y problema por titulación (diluciones seriadas del antisuero y del conjugado hasta obtener la máxima dilución que permita diferenciar muestras controles positivo alto, positivo bajo y negativo, utilizándose el mismo protocolo que para la técnica). Se siembran los sueros testigos y problema. Cada suero se procesa por duplicado. En cada microplaca se incluyen 3 sueros negativos y 1 positivo.

Las lecturas se efectúan en un lector vertical de placas con filtro a 405 nm.

El “cut - off” se determinara mediante el uso de curva ROC. En cada microplaca se incluirán 3 sueros negativos y uno positivo. (Coltorti, 1986; Gatti, 1996; 2007).

PROTOCOLO 2: OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE EN OVINOS

En los animales vivos inoculados experimentalmente en el año 2006 se obtendrá 10 cc. de sangre de la vena yugular, de animales sujetados en posición de pie y con la cabeza fijada lateralmente, utilzándose agujas 25/8 y jeringas plásticas descartables.

Los tubos serán rotulados con el número de identificación del animal (protocolo 5) y la fecha de obtención.

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.

PROTOCOLO 3: NECROPSIA

Todos los animales serán necropsiados en los últimos 3 meses del proyecto según protocolo estandarizado (Larrieu y col, 2005).

PROTOCOLO 4: DIAGNOSTICO HISTOLOGICO

Las muestras hepáticas de tejido normal y de lesiones con morfología hidática y/o compatibles con hidatidosis serán estudiadas histológicamente.

Para ello se empleará la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (Jubb, Kennedy, Palmer. 1993). En los casos en que se presenten quistes calcificados y/o contaminados, se utilizará la técnica de tinción de PAS (Periodic Acid Schiff - Reactivo de Acido Periódico de Schiff).

PROTOCOLO 5: INFESTACION EXPERIMENTAL

Obtención de *Echinococcus granulosus:*

Se dosificarán perros de áreas endémicas de la Provincia de Río Negro con el tenífugo B. de Arecolina (Larrieu y col, 1999). Los especímenes de *Echinococcus granulosus* obtenidos se conservarán en solución fisiológica adicionada de penicilina a una temperatura de 8/10º.

Animales de experimentación:

Se seleccionarán corderos de una majada existente en un establecimiento de la localidad de General Pico, Provincia de La Pampa , los cuales serán identificadas mediante caravana numerada. Se establecerá 1 grupos de 4 animales y uno de 2 animales. (testigo)

.

Obtención y procesado de sangre

Se obtendrán muestras de sangre en la forma establecida en protocolo 2, siendo procesados por Elisa (protocolo 1).

Post inoculación se obtendrán cada 48 horas muestras de sangre hasta aparición de seropositividad. Posteriormente se obtendrán muestras mensuales hasta el sacrificio de los anmales.

Inmunización

El grupo de cuatro animales será inmunizado con dos dosis de vacuna EG95 a los 15 días de edad y a los 60 días. El grupo testigo recibirá dos dosis de solución fisiológica

Preparación y administración de inóculos

Se prepararán inóculos de 5 cc de solución fisiológica con dosis de 1000 huevos separados de los proglótidos maduros a través de microscopia inversa , los que se aplicarán individualmente con punción intraruminal .al grupo de cuatro animales. (Conder y col, 1980; Torgerson y col, 1998; Larrieu y col, 2005)

PROTOCOLO 6: ULTRASONOGRAFIA

Los ovinos experimentalmente infectados en el año 2006 se evaluarán mediante semestralmente mediante ultrasonografía para estimar parámetros de respuesta y crecimiento, según protocolo estandarizado (Larrieu y col, 2005)

PROTOCOLO 7: DETERMINACIÓN S DE LA RESPUESTA INMUNECELULAR

Vacunación y Muestreo:
Independientemente del tratamiento indicado para los grupos, las ovejas serán vacunadas por vía subcutánea contra brucelosis al inicio del periodo experimental. Se aplicará la vacuna indicada para rumiantes mayores, constituida por la cepa 19 viva de Brucella abortus, con una concentración de 15-30 x 10^9 células bacterianas en fase lisa por dosis de 2 ml (Texnovac Argentina). Se tomarán cuatro muestras sanguíneas de la vena yugular en tubos heparinizados de 10 ml al momento de la aplicación de la vacuna (día 0), y a los 20 40 y 60 días posteriores a la inoculación.

Estimulación leucocitaria:
La estimulación será llevada a cabo mezclando en placas de 24 pocillos 1 ml de sangre con 100 µl de PBS (control negativo) o con igual volumen de antigénico específico (brucelina, 40 µg/ml). El antígeno desprovisto de preservativos será diluido en 100 µl de PBS. El cultivo se incubará por 18-24 horas a 37º C en una atmósfera conteniendo un 5% de CO_2. El sobrenadante será retirado y congelado a -20º C para la posterior cuantificación de IFN-γ (Weynants et al., 1995; Jacques et al., 2007).

Determinación de IFN-γ:
El contenido de IFN-γ será determinado usando un kit de ELISA (IFN-γ EASIA, Biosource Europe, Belgium). La lectura de las placas se hará con una longitud de onda de 450 nm. Se determinará la absorvancia media de los controles negativos, estableciéndose el límite de corte (cut-off) como la media de la absorvancia de los controles negativos más 0.150 como es recomendado por el fabricante.

6.2.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.

Las bajas prevalencias actuales en los tres hospederos principales en programas de control como los de las Provincias de Río Negro y Tierra del Fuego, requieren de la utilización de técnicas más sensibles y específicas que las aplicadas hasta el momento.

En el caso del ovino, se encuentra disponible el análisis macroscópico en sala de faena, sobre el que se han planteado importantes limitaciones y una técnica de ELISA, utilizando antigeno total para el diagnóstico serológico de la equinococcosis quística en ovinos naturalmente infectados, esperándose en el presente estudio aportar información sobre la respuesta inmune a todo lo largo de la vida del animal, a los efectos de interpretar adecuadamente los resultados de la serología cuando son aplicados en programas de control.

En igual forma se espera dilucidar aspectos relacionados a la aparición de imágenes ecográficas en función del crecimiento del parásito, los cuales podrán ser aplicados al diagnóstico de la equinococcosis en el hombre.

Asimismo, se espera aportar nueva información sobre la producción de antígenos y la respuesta inmune humoral y celular en corderos experimentalmente infectados**.**

Finalmente, se espera corroborar la capacidad protectiva de la vacuna EG95, sujeto a su disponibilidad en el mercado

6.3. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

- Primer año: Obtención de equinococcus, preparación y administración de incóculos. Inmunización. Inoculación experimental. Controles serológicos y ultrasonográficos en grupo experimental 2006 y grupo experimental de ovinos 2008.
- Segundo año: Necropsia grupo de animales 2008. Controles serológicos y ultrasonográficos mensuales grupo de animales 2006
- Tercer año: Controles serológicos y ultrasonográficos. Necropsias Análisis histopatológicos. Análisis serológicos. Análisis de resultados

7. INFRAESTRUCTURA Y PRESUPUESTO

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

- Infraestructura de la Cátedra de Patología General y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Gral Pico para los estudios histológicos
- Infraestructura de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias para la preparación de inóculos.
- Mantenimiento de la majada y extracción de las muestras por parte del equipo de investigación.

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

- Infraestructura del laboratorio de Salud Ambiental Viedma para el análisis serológico
- Apoyo de la Unidad de Parasitología del Instituto Nacional de Microbiología Carlos Malbrán para la provisión de antígenos.

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

7.4. ESPECIFICAR OTRAS FUENTES DE FINANCIACIÓN:

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

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

- Equipamiento e Infraestructura
  Lupa parasitológica $ 10000

- Bienes de Consumo
  Material de Vidrio, Caravanas, Pipetas, Jeringas, Agujas $ 4000.

  Ovinos de experimentación $ 3000

  Bibliografía $ 1000.

  Viáticos, pasajes y combustibles (asistencia a congresos, tareas de campo) $ 4000

  Fardos de pasto $ 4000

  Kit para análisis de respuesta celular $ 3000

Total ……. $ 29000

8. BIBLIOGRAFÍA

1. CABRERA, P.; HARAN, G.; BENAVIDEZ, U.; VALLEDOR, S.; PERERA, G. 1995. Transmission of Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and Taenia ovis in sheep in Uruguay. *Int J Parasitol* 25:807-813
2. COLTORTI, E.; VARELA DIAZ, V. 1978. Detección of antibodies against Echinococcus granulosus arc 5 antígens by doubble diffusion test. Trans Roy Trop Med Hyg 72:226-229
3. COLTORTI, E. 1975. Inmunología e inmunidiagnóstico de la hidatidosis. Medicina (Bs As) 35:369-370
4. CRAIG, P. 1993. Immnunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and a comparison of techniques for diagnoses of canine echinococcosis .. In Compendium on echinococcosis in Africa and in a Middle Eastern Countres (Andersen, F.; Ouhelli, H.; Kachani, M.) Brigham Young University Print Services, Utah, 86-118
5. CONDER, G.; ANDERSEN, F.; SCHANTZ, P. 1980. Immunodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: an evaluation od double diffusion, immunoeletrophoresis, indirect hemagglutination, and intradermal tests. *J. Parasitol* 66:577-584
6. DEL CARPIO, M.; MOGUILANSKY, S.; COSTA, M.; PANOMARENKO, H.; BIANCHI, C.; BENDERSKY, S.; LARRIEU, E. 2000. Diagnosis of human hydatidosis: predictive value of the rural ultrasonographic survey in ann apparently helth population. *Medicina* 60:466-468
7. DUEGER, E.; GILMAN, R. 2001, Prevalence, intensity and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central peruvian andes. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 95:379-383
8. ECKERT, J.; DEPLAZES, P.; CRAIG, P.; GEMMEL, M.; GOTTSTEIN, B.; HEATH, D.; JENKINS, J.; KAMIYA, M.; LIGHTOWLERS, M. 2001. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. 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
9. GATTI. A. 1996. Estandarización de una técnica de enzimoinmunoensayo para el diagnóstico de la hidatidosis humana. *A Bioq Clin Latinoamer* 30:333-342
10. 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 143 117:112-121
11. 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
12. 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
13. GUARNERA, E.; ZANZOTTERA, E.; PEREYRA, H.; FRANCO, A. 2001. Ultrasonographic diagnosis of ovine cystic echinococcosis. *Vet. Radiol Ultrasound* 42:352-354
14. HEATH, D., JENSEN, O., LIGHTOWLERS, M. 2003. Progress in control of hy datidosis using vaccination – a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Tropica 85:133-143

15. JACQUES, I., VERGER, J-M., LAROUCAU, K., GRAYON, M., VIZCAINO, N., PEIX, A., CORTADE, F., CARRERAS, F., GUILLOTEAU, L. A. 2007. Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by *bp*26 and *omp*31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. Vaccine, 25: 794-805.
16. JUBB, K.; KENNEDY, P.; PALMER, N. 1993**.** Pathology of Domestic Animals, fourth edition. Volumen II, editorial Academic Press Inc
17. KITELBERGER, R.; REICHEL, M.; HEATH, D. 1999. Detection of serum antibodies by immunoblot and elisa in sheep infected with *Echinococcus granulosus.* in Resumenes XXXIII International Congress of Hydatidology, Bariloche, Argentina. 271
18. LAHMAR, S.; KILANI, M.; TORGERSON, P.; GEMMEL, M. 1999. *Echinococcus granulosus* larvae in the liver of sheep in Tunisia: the effects of host age. *Ann Trop Med Parasitol* 93:75-81
19. LARRIEU, E.; COSTA, M.; CANTONI, G.; LABANCHI, J.; BIGATTI, R.; ARAYA, D.; HERRERO, E.; IGLESIAS, L.; MANCINI, S.; THAKUR, A. 1999. Rate of infection and of reinfection by *Echinococcus granulosus* in rural dogs of the Province of Rio Negro. *Vet Parasitol* 87: 281-286
20. LARRIEU, E.; FRIDER, B.; SALVITTI, J.; MERCAPIDE, C.; DEL CARPIO, M.; COSTA, M.; ODRIOZOLA, M.; PEREZ, A.; SUSTERCIS, J. 2000a. Portadores Asintomáticos de Hidatidosis: Epidemiología, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev Panam Salud Pública* 79: 250-256
21. LARRIEU, E.; MERCAPIDE, G.; DEL CARPIO, M.; SALVITTI, J.; COSTA, M.; ROMEO, S.; CANTONI, G.; PEREZ, A.; THAKUR, A. 2000b. Evaluation of the losses produced by hydatidosis and cost/benefit analysys of different interventions of control in the Province of Rio Negro, Argentina. *Bol Chilen Parasitol* 55:8-13
22. LARRIEU, E.; COSTA, M.; CANTONI, G.; ALVAREZ, R.; CAVAGION, L.; LABANCHI, J.; BIGATTI, R.; ARAYA, D.; HERRERO, E.; MANCINI, S.; CABRERA,. P. 2001. Ovine *Echinococcus granulosus* transmission dynamics in the province of Rio Negro, Argentina, 1980-1999. *Vet Parasitol* 98:263-272
23. LARRIEU, E., DEL CARPIO, M., SALVITTI, J., MERCAPIDE, C., SUSTERSIC, J., PANOMARENKO, J., COSTA, M., BIGATTI, R., LABANCHI, J., HERRERO, E., CANTONI, G., PEREZ, A., ODRIOZOLA, M. 2004. Ultrasonographic diagnosis and medical treatment of human cystic echinococcosis in asymptomatic school age carriers: 5 years of follow-up. Acta Tropica 91: 5-13
24. LARRIEU, E.; GATTI, A.; ALVAREZ, R.; VESPOLI, V.; ARAYA, D.; MANCINI, S.; BIGATTI, R.; CAVAGION, L. 2007. Equinococcoisis ovina: respuesta inmune y fisiopatología de la infección en ovinos experimentalmente infectados. Rev Med Vet 87: 91-99 Equinococcisis ovina: respuesta inmune y fisiopatología de la infección en ovinos experimentalmente infectados. Rev Med Vet 87: 91-99, 2006
25. LIGHTOWLERS, M.*;* GOTTSTEIN, B. 1986. Echinococcosis/Hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. The biology of *Echinococcus granulosus* and hydatid disease (Thompson, R; Lymbery, J.) 355-396 George Allen and Unwin. London
26. 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
27. MAXSON, A.; WACHIRA, T.; ZEYHLE, E.; FINE, A.; SMITH, G. 1996. The use of ultrasound to study the prevalence of hydatid cysts in the right lung and liver of sheep and goats in Turkana, Kenya. *Int J Parasitol* 26:1335-1338

28. MORO, P.; VERASTEGUI, M.; GILMAN, R.; FALCON, N.; BERNAL, T.; GAVIDIA, C.; MALQUI, V.; MORO, M.; DUEGER, E. 1997, Enzime linked immunoelectrotransferblot assay for diagnosis of hydatidosis in sheep. *Vet Record* 140:605-606
29. ORIOL, R.; WILLIAMS, J.; PEREZ ESANDI M.; ORIOL, R. 1971. Evaluation of purified lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus in the immunodiagnosis of human infection. *Am J Trop Med Hyg* 20:569-574
30. ORTONA, E.; SIRACUSANO, A.; CASTRO, A.; RIGANO, R.; IOPOLO, S.; NOTARGIOCOMO, S.; FROSCVH, M. 1995. Use of a monoclonal antibody against the antigen B of *Echinococcus granulosus* for purification and detection of antigen B. *Appl parasitol* 36:220-225
31. RODRIGUEZ, M.; RIBEIRO, E.; SOUSA, S.; RODRIGUEZ, J. 1999, Immundiagnosis of sheep hydatidosis and detection of cross reactivity with tenia hydatigena infection. in Resumenes XXXIII International Congress of Hydatidology, Bariloche, Argentina. 269
32. 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
33. RUIZ, A.; SCHANTZ, P.; PRIMO ARAMBULO III. 1994. Procedings of the Scientific Working Group on the advances in the prevention, control and treatment of Hydatidosis. PAHO/HCP/95/01, 306 pag.
34. SIRACUSANO, A.; VUITTON, D. 1997.Immunologu and immunopathology of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* infection. *Arch Int Hidat*. 32:132-135
35. 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
36. 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
37. TORGERSON, P.; CARMONA, C.; BONIFACINO, R. 2000. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country upper middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 94:703-713
38. VARELA DIAZ, V.; COLTORTI, E.; RICKARD, D.; TORRES, M. 1977. Comparartive antigenic characterisation of Echinococcus granulosus and Tenia hydatígena cyst fluids by inmunoelectrophoresis. *Research in Veterinary Science* 23:213-216
39. WEYNANTS, V., GODFROID, J., LIMBOURG, B., SAEGERMAN, C., AND LETESSON, J-J. 1995. Specific bovine Brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. Journal of Clinical Microbiology, 33: 706-712.