FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

ESPECIALIDAD EN SALUD PÚBLICA VETERINARIA

"Evaluación de la respuesta humoral en ovinos vacunados con la vacuna EG95 contra la hidatidosis, en Rio Negro, Argentina".

AUTOR: Daniel Alberto Araya

FECHA DE ENTREGA: JULIO DE 2018

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

ESPECIALIDAD EN SALUD PÚBLICA VETERINARIA

"Evaluación de la respuesta humoral en ovinos vacunados con la vacuna EG95 contra la hidatidosis, en Rio Negro, Argentina". -

AUTOR: Daniel Alberto Araya

FECHA DE ENTREGA: JULIO DE 2018

DIRECTOR DE LA TESINA: Dr. Edmundo Larrieu

CODIRECTOR DE LA TESINA: Dr. Leonardo Molina

LUGAR DE REALIZACION DE LA TESINA: Unidad Regional de Epidemiología y Salud Ambiental (URESA) Línea Sur, Los Menucos, Rio Negro Argentina. -

FECHA DE REALIZACION DE LA TESIS: MARZO, ABRIL, MAYO, JUNIO 2018

4 1		•	
Agrad	ecım	ueni	os:

A Edmundo Larrieu, Director de la tesina: Por ser el impulsor en la realización de esta tesina y por su asesoramiento y acompañamiento. -

A Leonardo Molina, Codirector de la tesina por su predisposición y acompañamiento en la realización del trabajo. -

Dedicatoria:

A mi esposa y tres hijos por su apoyo incondicional

Los resultados de esta tesis fueron parte de lo publicado en:

Larrieu E., Mujica G., Araya D., Arezo M., Herrero E., Santillán G., Vizcaychipi K., Labanchi J.L., Grizmado C., Calabro A., Talmon G., Sepúlveda L., Galvan J.M., Cabrera M., Seleiman M., Crowley P., Cespedes G., García Cachau M., Gino L., Molina L., Daffner J. Impacto de la vacuna EG95 contra la hidatidosis ovina en el programa de control de la provincia de Río Negro, Argentina. Ocho años de trabajo (informe preliminar). CIENCIA VETERINARIA, Vol. 19, Nº 1, enero-junio 2017, ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea), pp. 30-49 DOI: http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-20171913

INDICE: Pag.N°

Resumen	6
CAPITULO I Introducción	7
Biología de Echinococcus granulosus	7
Agente etiológico	7
Forma adulta o estrobilar	8
Huevos de Echinococcus granulosus	8
Forma larval o metacestode	9
Ciclo biológico	10
Equinococcosis quística en el hombre	12
Síntomas clínicos, patología, diagnóstico	12
En los animales	12
En el hombre	13
Epidemiología	14
Factores de riesgo	14
Pérdidas económicas	15
Distribución y ocurrencia	15
Control y vigilancia de la equinococcosis	16
Control	16
Programa de Control en Río Negro	18
Vigilancia epidemiológica	18
Objetivo	21
CAPITULO II Materiales y métodos	21
Área de Trabajo	21
Vacunación	22
Obtención de muestras	22
Laboratorio	22

Análisis Estadístico	23
Declaración de ética	24
CAPITULO III Resultados	24
CAPITULO IV Discusiones	25
CAPITULO V Bibliografía	30

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

Figura 1: Microfotografía de un <i>Echinococcus Granulosus</i> y su ubicación intestinal	8
Figura 2: Estructura de la oncósfera y del metacestode	10
Figura 3: Ciclo de transmisión	12
Figura 4: Fotografía tomada por M. Odriozola en Bariloche, Río Negro (Archivada en Ministerio de Salud de Río Negro)	14
Tabla 1: Estudios epidemiológicos de base y de impacto en diferentes programas control de América del Sur	17
Tabla 2: Historia de la prevalencia de Equinococosis en Río Negro.	19
Figura 5: Mediana, rango intercuartil y el rango del suero de IgG específico anti-EG95	27
Figura 6: Mediana, rango intercuartil y el rango del suero de IgG específico anti-EG95	28
Tabla 3: Características de los no vacunados y ovejas vacunadas con EG95 entre 2009 Y 2015, en la Provincia de Río Negro, Argentina en 2015	29

RESUMEN:

La enfermedad Equinococosis quística (EQ) es endémica en la provincia de Rio Negro, Argentina, y por esto, se desarrolló un programa de control utilizando praziquantel en perros a partir de 1980. En el 2009 se incorporó la vacunación de ovinos con la vacuna recombinante EG95 en algunas áreas de la provincia. El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta humoral a la vacunación, determinando títulos de anticuerpos contra la proteína EG95 en condiciones de campo. Los corderos recibieron dos dosis con la vacuna EG95 seguidas de una dosis única de refuerzo, cuando los animales tenían 1 - 1.5 años de edad. El área de trabajo abarcó una zona de vacunación comprendida por los siguientes parajes: Anecón Grande (lat. -41.3215 long -70.2742), Rio Chico Abajo (lat. -41.7098 long-70.4761) Mamuel Choique, Nahuel Pan y una región de control sin vacunación integrada por: Blancura Centro (lat.: -40.4238-long: -69.6146) y Lipe tren, ubicadas en la provincia de Rio Negro, representando un área total de 5.820 Km². Todos los animales vacunados fueron identificados con una caravana de color diferente para cada año del proyecto. Se evaluó la respuesta de anticuerpos específicos contra la proteína EG95 en muestras de suero de 341 animales. De éstos, 178 pertenecían al grupo vacunado y 163 correspondían a los grupos control no vacunados. Las respuestas anti-EG95 se determinaron utilizando un lector de placas ELISA automatizado. Después de la tercera vacunación, a los 1-1,5 años de edad, hubo un aumento del título mayor que el observado después de dos inmunizaciones. Esta respuesta se mantuvo longitudinalmente a lo largo del tiempo, por lo menos 5 años.

Palabras clave: Equinococosis, vacuna EG95, Ovino, respuesta humoral.

Capítulo I-Introducción:

La *Equinococosis* quística (EQ) es una enfermedad parasitaria causada por la infección de la fase larvaria del parasito cestodo *Echinococcus granulosus* (EG). La infección se transmite generalmente entre animales de producción ganadera de pequeño porte, especialmente ovina y caprina, y los perros. Los seres humanos también pueden desarrollar EQ si los huevos de las heces de un perro infectado son ingeridos accidentalmente. En los seres humanos la infección se manifiesta como masas quísticas, comúnmente halladas en el hígado y/o los pulmones. La enfermedad es reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una importante enfermedad tropical desatendida (Larrieu y Zanini, 2012).

Desde el desarrollo de la muy efectiva droga praziquantel, a nivel mundial, la mayoría de los esfuerzos para controlar la transmisión de *E. granulosus* (EG) se han basado en el tratamiento de perros con este fármaco. Sin embargo, en muchas áreas, las dificultades para acceder a la población de perros de forma suficientemente regular, han limitado la eficacia de los esfuerzos de control, de modo que la interrupción de la transmisión del parasito no se ha logrado (Budke et al., 2008; Larrieu y Zanini, 2012).

Biología de Echinococcus granulosus

Agente etiológico:

La equinococosis quística (EQ) o hidatidosis es una zoonosis parasitaria producida por un endoparásito perteneciente al *Phylum Platyhelminthes*, Clase Cestoda, familia Taeniidae, género *Echinococcus*, especie *granulosus*.

Desde los tiempos de Hipócrates de Cos (hacia 460-380 aC), se conocía la hidatidosis en los seres humanos. En tanto Rudolp Leuckart es el primero en describir el ciclo biológico de la tenia en 1853, publicando en 1863 una revisión sobre su biología en animales y el hombre (Leuckart, 1863 citado por Rausch, 1995; Thompson, 1995).

El género E*chinococcus* fue establecido para la forma larval, designándolo Taenia visceralis socialis granulosa por Goeze en 1782, mientras que Batsch en 1786 adopta el sistema binario de nomenclatura y le asigna el nombre Hidatigena granulosa (Thompson, 2001).

El parasito requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida. Un hospedero definitivo, (carnívoro, especialmente el perro) desarrolla la faz

adulta o estrobilar y un hospedero intermediario (ovino, bovino, caprino) en donde se desarrolla la faz larvaria o metacestode (Thompson, 2001).

Existen diversidad de cepas de E.G., 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 (Eckert et al., 1997; Rosenzvit et al., 1999; Kamenetzky et al., 2002).

Forma adulta o estrobilar:

La forma adulta corresponde a una tenia blanca que mide de 3 a 7 mm de longitud que se localiza en el intestino delgado del hospedador definitivo.

Posee un órgano especializado de fijación (escólex) que incluye dos coronas de ganchos ubicados en el rostelo y cuatro órganos musculares. El cuerpo es segmentado y consiste en un número de unidades reproductivas o proglótidos (generalmente 4), resultando la reproducción sexual y hermafrodita. Los proglótidos maduros, conteniendo un promedio de 587 huevos fértiles, son eliminados con la materia fecal del hospedador a razón de 0.071 proglótidos por tenia por día (Gemmel et al., 1995; Thompson, 2001).

El tiempo de vida del parásito se encuentra comprendido entre 10 meses y 4 años (Thompson, 2001). En la figura 1 se observa una microfotografía de un *E.G* y su ubicación intestinal.

Figura 1: Microfotografía de un *Echinococcus granulosus* y su ubicación intestinal (Thompson, 2001).



Huevos de E.G.

Los huevos son de características ovoideas, de 30 a 40 micras de diámetro, conteniendo un embrión hexacanto (oncósfera o primer estado larval) envuelto en varias membranas y una gruesa pared queratinizada y de alta resistencia (embriósforo) (Thompson, 2001).

Morfológicamente no son distinguibles de los huevos de otras tenias. Actualmente es posible identificarlos mediante técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (Cabrera et al., 2002).

Son muy resistentes a las condiciones climáticas pudiendo permanecer viables un año en un amplio rango de temperatura (4 a 15 grados centígrados). Son sensibles a la desecación pudiendo morir en 4 días a una humedad ambiente de 0% o en 5 días a una temperatura de 60°C (Gemmel et al., 1995; 2001).

Depositados en el ambiente, los huevos pueden llegar a desplazarse hasta 180 m. del lugar de la defecación y pueden ser dispersados en áreas de hasta 30000 ha. por dípteros y escarabajos coprófagos que actúan como transportadores, contaminando grandes extensiones de campo, el agua de arroyos y pozos de bebida, verduras, etc., pudiendo también permanecer adheridos a los pelos y ano del perro. (Gemmel et al, 1995, 2001).

Forma larval o metacestode:

Cuando huevos de E.G. 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 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 et al., 2001).

La reacción local del organismo a la presencia del metacestode incluye infiltración inflamatoria con presencia de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos e hiperplasia del tejido conectivo dada por fibras eosinófilas con núcleo fusiforme (Cavagion et al., 2002).

Las formaciones quísticas en el ovino suelen ser múltiples (Eckert et al., 2001). La reproducción en el metacestode es asexual y consiste en la producción por parte de la membrana germinal de cientos de protoescólices invaginados y vesículas hijas. Tabiques internos y septos pueden ir separando la cavidad principal en múltiples cavidades secundarias (Cavagion et al., 2002).

La membrana germinal, desde el punto de vista de la ultraestructura, es similar al tegumento de la forma estrobilar y consiste en un sincitium con microtrichias proyectadas en la membrana laminar (Thompson, 2001).

La reorganización de la oncósfera y la formación de las membranas germinal y laminar ocurren rápidamente (en los primeros 14 días). El período prepatente es largo pudiendo tardar, según distintos autores, entre 2 a 6,5 años en producir protoescólices (Eckert et al., 2001; Thompson, 2001; Torgerson et al., 2003).

En ovinos experimentalmente infectados se han identificado protoescólices en un solo quiste hepático a los 584 días posteriores a la infección (Gusbi et al., 1991). El meta cestode puede sobrevivir durante toda la vida del animal (Eckert et al., 2001).

La presencia de protoecólices transforma al quiste hidatídico en fértil y si estos además se hallan vivos, se clasifica al quiste hidatídico como viable (Cavagion et al., 2002), (Yildiz et al., 2003).

La fertilidad aumenta con la edad del animal. Ello puede visualizarse considerando distintos trabajos de campo, por ejemplo, Cabrera et al., (1995), describen un 4.5% de quistes fértiles en animales de tres años de edad con una viabilidad del 36%, Torgerson et al, (2003b), por su parte informan 50% de quistes ovinos fértiles a los 6,6 años de vida del animal, mientras que Dueger et al (2001) encuentran un 0% de quistes fértiles en ovinos menores de 3 años. También se ha notificado que el número de protoescólices viables aumenta con el tamaño del quiste (Yildiz et al., 2003) y disminuye en animales menores de 3 años de edad (Dueger et al., 2001).

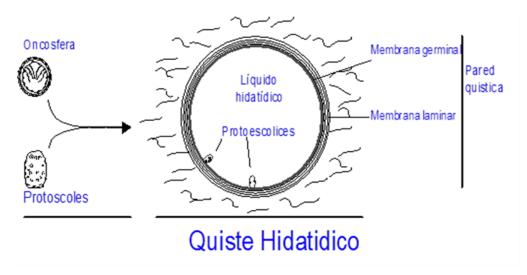


figura 2. Esquema de la estructura de la oncósfera y del metacéstode

Extraído de la Tesis Doctoral Análisis de la respuesta inmune y diagnóstico de la equinococosis quística en ovinos mediante un ensayo inmunoenzimático. (Larrieu et al 2004).

Ciclo biológico:

Los carnívoros se infectan por la ingestión de protoescólices viables ubicados en las vísceras infectadas por la forma larval. ovinos (*Ovis aries*) parasitados pueden ser faenados por el hombre con fines de alimentación o pueden morir en el campo por otras causas. Si sus vísceras son ingeridas por un perro o por otro carnívoro, los cientos de

embriones hexacantos contenidos en un quiste hidatídico serán liberados en el intestino del animal dando lugar a la formación de nuevas tenias (Gemmel et al., 1995; 2001).

El período prepatente es corto, aproximadamente 7 semanas, momento en que comienza la liberación con la materia fecal del perro (*Canis comunis*) del primer proglótido maduro con su carga de huevos infectantes. (Gemmel et al., 1995; 2001).

La reinfección de los canes es rápida. Perros de áreas endémicas tratados con antihelmínticos han mostrado en Uruguay tasas de infección del 5,2% a los 60 días posteriores al tratamiento y del 18,6% a los 120 días, mientras que, en Río Negro, Argentina, resultaron del 6,7% y 21,3% respectivamente (Cabrera et al., 1996; Larrieu et al., 1999).

Infestaciones repetidas generadas por ingestión de protoescólices presentes en quistes hidatídicos fértiles pueden generar inmunidad natural en los perros. Se ha señalado que hasta un 50% de ellos pueden adquirir inmunidad luego de la sexta infestación (Gemmel et al., 1995; 2001).

Los ungulados (ovinos, bovinos, porcinos, caprinos, guanacos, etc.) adquieren la infección por la ingestión de huevos del parásito liberados al ambiente (Thompson, 2001).

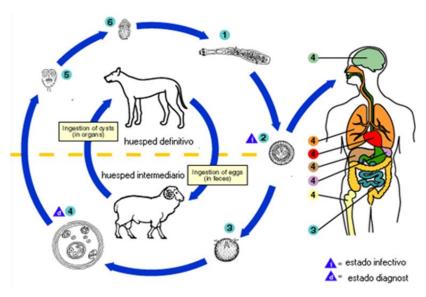
La proporción de huevos que se transforman en quistes viables en el ovino es de 0,0033 (Gemmel et al., 1986; Torgerson et al., 1998).

El potencial biótico de E.G. (número potencial de quistes viables que pueden ser producidos por perro infectado por día) es bajo comparado con otros cestodes, por lo que la presión de infección en el ovino puede no ser suficiente para producir inmunidad adquirida por ingestión continua de huevos, especialmente en las dos semanas siguientes a la infestación. En áreas de alta prevalencia, la presencia masiva de huevos podría generar en los ovinos inmunidad adquirida, la cual puede permanecer largo tiempo e impedir una nueva infestación o puede perderse cuando las áreas de pastoreo permanecen libres de huevos durante 6 a 12 meses, provocando un aumento de la prevalencia de la infestación con la edad (Gemmel et al., 1986; Cabrera et al., 1995).

Si bien el ciclo principal de E.G. comprende animales domésticos, pueden producirse ciclos selváticos entre el zorro (*Dusicyon culpaeus*, *Dusicyon griseus*, *Vulpes vulpes*) y la liebre (*Lepus europaeus*) (Schantz et al., 1976; Gemmel et al., 2001).

Las distintas cepas de E.G. pueden poseer períodos de prepatencia de diferente magnitud y diferente infectividad para el hombre (Eckert et al., 1997; Rosenzvit et al., 1999).

Figura Nº 3 Ciclo de transmisión:



1: Forma adulta en intestino delgado del perro; 2: oncósfera embrionada en materia fecal; 3: oncósfera penetra en pared intestinal del hospedador intermediario; 4 principales localizaciones del metacestode: hígado y pulmón; 5: protoescólices intraquísticos; 6: escólices enganchados en pared intestinal. (http://www.alaskanmalamutes.es/perros/salud/tenias-perros.html)

Equinococosis quística en el hombre:

El hombre es hospedero del metacestode y se infecta al ingerir huevos fértiles adheridos al ano o pelos de perros parasitados o por la ingestión de verduras o aguas contaminadas con materia fecal canina.

Los huevos eclosionan liberando el embrión hexacanto en el intestino delgado, pasan a la circulación venosa hasta alojarse en el hígado (principal localización), pulmón (segunda localización de importancia) u otra víscera o tejido, donde se formará la hidátide o quiste hidatídico (generalmente solo uno) (Ammann et al., 1995).

Síntomas clínicos, patología, diagnóstico:

En los animales:

El perro:

Puede ser portador de cientos de parásitos en el intestino delgado (especialmente en los primeros 30 cm) sin que este sufra daños o síntomas aparentes (Eckert et al., 2001).

El diagnóstico es por identificación macroscópica del parásito, en la necropsia o luego de la dosificación del perro con el tenífugo bromhidrato de arecolina. Actualmente se dispone de otros métodos indirectos, tal como la identificación de antígenos parasitarios en materia fecal del perro o en sangre (Craig, 1997; Eckert et al., 2001).

Herbívoros:

El quiste hidatídico crece muy lentamente y pueden transcurrir muchos años hasta que alcance un tamaño que pueda causar síntomas al animal. Según la edad de faena, por tanto, pueden permanecer asintomáticos durante toda la vida del animal. Sin embrago, según el órgano afectado, el tamaño y número de los quistes presentes y su interacción con estructuras adyacentes pueden presentarse síntomas vinculados a las lesiones producidas por el parásito en sus diversas localizaciones, aunque con especial referencia a disfunción hepática (Eckert et al., 2001).

El diagnóstico esencial es post mortem en sala de faena. La morfología es suficientemente característica para identificar quistes hidatídicos maduros. Sin embargo, lesiones pequeñas pueden requerir de cortes seriados de hígado y pulmón cada 2 mm para asegurar su identificación. Quistes complicados requieren de la confirmación histológica, en donde la identificación de una membrana acelular positiva con o sin membrana germinal adyacente es característica específica para la confirmación (Craig, 1997; Eckert et al., 2001; Cavagión et al., 2002).

El diagnóstico mediante ultrasonografía (Guarnera et al., 2002) y mediante diversos métodos inmunológicos (Craig, 1997) se encuentra ahora disponible, aunque con importantes limitaciones prácticas.

Se ha reportado una disminución causada por *equinococosis* quística del 2.5% en el peso de la canal ovina y del 11% en el número de corderos nacidos (Torgerson et al., 2003).

En el hombre

El crecimiento del metacestode dependerá del potencial evolutivo del embrión hexacanto, del tejido circundante y de la resistencia del hospedador. Puede ser muy rápido (5 o 10 cm en pocos años) y generar síntomas graves con riesgo de muerte para el portador o puede comportarse en forma benigna, crecer no más de 2 a 7 cm y envejecer con su portador sin producir daño a la salud (Frider et al., 1999; Larrieu et al., 2001; Larrieu, 2002).

Los síntomas variarán de acuerdo con la víscera afectada. En la localización hepática se observará mala digestión, tumores abdominales, ictericia y dolor hepático; en la localización pulmonar dolores de pecho, fatiga, cansancio y tos (Ammann et al., 1995).

Figura 4: Fotografía tomada por M. Odriozola en Bariloche, Río Negro (Archivada en Ministerio de Salud de Río Negro)



El diagnóstico puede ser clínico, inmunológico (doble difusión cinco, enzimoinmuno ensayo, western blot o mediante imágenes (ultrasonografía, tomografía, radiología (Ammann et al., 1995).

El tratamiento tradicional es quirúrgico, aunque en los últimos años se dispone de alternativas menos invasivas, tal como punción-aspiración, videolaparascopía y quimioterapia con albendazol (Nahmias et al., 1994; Dermirbilek et al., 2001; Ramachandran et al., 2001; Peláez et al., 2002; Larrieu et al., 2003).

Epidemiología:

Factores de riesgo:

La equinococosis quística afecta principalmente a los habitantes de zonas rurales. Los principales factores de riesgo son la cría de lanares asociada a la tenencia de gran número de perros y al hábito de faenar ovinos adultos para consumo propio y alimentación del perro.

Estudios de casos y testigos han permitido cuantificar estos y otros factores de riesgo para la equinococosis quística (Cohen et al., 1998; Campos-Buenos et al., 2000;

Larrieu et al., 2002). Los de mayor importancia epidemiológica detectados en el análisis multivariado, para un área rural de la Provincia de Río Negro son: faenar ovinos en el domicilio (OR 3.2 IC95% 1.3-9.1), convivir con un elevado número de perros en los primeros años de vida (OR 2.6 IC95% 1.3-46.8), antecedentes de casos de hidatidosis en el núcleo familiar (OR 2.5 IC95% 0.0-6.7) y utilizar agua no potable para beber (OR 0.1, IC95% 0.05-0.4, factor de protección). Asimismo, es estadísticamente significativo el aumento del riesgo en función de poseer un mayor número de perros durante la vida (p: 0.0003) y el número de años de vida del hombre en el medio rural (p: 0.033) (Larrieu et al., 2002). Similares resultados, en especial la identificación del agua no potable como factor de riesgo, ha sido notificado (Cohen et al., 1998; Campos-Buenos et al., 2000).

Pérdidas económicas:

La equinococosis quística es una de las enfermedades zoonóticas que produce mayores pérdidas económicas en función del valor de las vísceras decomisadas, pérdidas en la producción de lana, leche y carne y para los sistemas de salud debido a los costos de internación y tratamiento de las personas (Larrieu et al., 2000c).

Distribución y ocurrencia:

América del Sur se encuentra entre las regiones del mundo más afectadas por la equinococosis quística, existiendo varios estudios relacionados a la prevalencia de la enfermedad en los distintos hospedadores, antes de la aplicación de medidas de control que han modificado la historia natural de la enfermedad en algunos países de la región:

- A. Estimación de la prevalencia de la infección en el ovino mediante estudios en sala de faena: 26% en el sur del Brasil, 77.4% en Perú, 80% en Región XI y 60% en Región XII en Chile y 18% en Uruguay. En Argentina se ha notificado un 61% de prevalencia en la Provincia de Río Negro, 75% en la Provincia de Tierra del Fuego y 59.3% en Islas Malvinas (De Zabaleta et al., 1986; Ruiz et al., 1994; Cabrera et al., 1995; Moro et al., 1999; Zanini et al., 1999; Dueger et al., 2001).
- B. Estimación de la prevalencia en perros mediante encuestas con bromhidrato de arecolina: 28.3% en Brasil, 32% en Perú, 10.7% en Uruguay, 54% en la Región XI y 71% en la Región XII de Chile. En Argentina se ha reportado el 42% en la Provincia de Río Negro, 28.2% en Neuquén y 40.2% en Cushamen, Chubut. (Vidal et al., 1990; Ruiz et al., 1994; Moro et al., 1999; Larrieu et al., 2000ª).
- C. Estimación de la prevalencia en el hombre mediante tamizajes ultrasonográficos aplicados en población humana no sintomática: 1.6% en Tacuarembó, Uruguay, 1.6% en Florida, Uruguay, 3.6% en Durazno, Uruguay y 5.1% en Vichaycocha, Perú. En Argentina se ha notificado el 5.5% en Río Negro y 14.2% en Loncopué, Neuquén (Larrieu et al., 2000b, 2001b; Cohen et al., 1998; Carmona et al., 1998; Frider et al., 1988; 2001).

Desde el punto de vista de la incidencia en el hombre, se ha estimado en más de 2000 los casos humanos nuevos notificados cada año en la región, con tasas de incidencia del 41 x 100000 en la región patagónica del sur de la Argentina, 80 x 100000 en la Región XI de Chile y 100 x 100000 en el Departamento Flores de Uruguay (Ruiz et al., 1994).

La tasa de reproducción del parásito (Ro), sin la aplicación de medidas de control, fue estimada en Uruguay mediante la aplicación de modelos matemáticos determinándose un valor de 1.2, indicativo de un estado endémico de transmisión parasitaria (Cabrera et al., 1995).

Control y vigilancia de la equinococosis:

Control:

En América del Sur, los primeros programas estructurados fueron el Programa Piloto de Estudio y Lucha contra la Hidatidosis desarrollado por la Provincia del Neuquén, Argentina, en el Departamento Huiliches entre los años 1970 y 1985 (De Zabaleta et al., 1986) y el Programa Piloto de Control de la Hidatidosis desarrollado en el Departamento de Flores, Uruguay, a partir de 1973. Ambos programas se basaron en la dosificación de perros con bromhidrato de arecolina cada seis semanas.

Programas exitosos basados en la desparasitación sistemática con praziquantel, se han desarrollado posteriormente en Uruguay, Chile y Argentina, con distintos modelos de organización.

En las regiones XI y XII de Chile el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) logró en 1977 llevar la prevalencia en perros a solo el 0.35% y en ovinos al 1.3% (Ruiz et al., 1994).

En Uruguay, la autónoma Comisión Honoraria de Lucha contra la Hidatidosis logró en 1997 una prevalencia en perros del 0.7% y en ovinos de 4/6 dientes del 7.6% (Economides et al., 2001).

En Argentina los Servicios Provinciales de Salud Pública, extendieron en el período 1975 – 1982 los programas de control a la totalidad de las Provincias del Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego colocándose bajo control 64000 canes en 437636 Km² (Ruiz et al., 1994).

En la Provincia de Río Negro en 1997 la prevalencia en perros había disminuido al 2.3% y en ovinos al 18% determinándose una tasa de reproducción del parásito de 0,53%, indicativo de un estadio reproductivo hacia la extinción. La prevalencia de portadores humanos de quistes hidatídicos determinada con ultrasonografía, por su parte, bajó al 1.1% (Larrieu et al., 2000ª, 2001ª, Frider et al., 2001).

En la Provincia de Tierra del Fuego, en 1996, la prevalencia en perros era del 2.5%, en ovinos del 1.1% y en niños de 7 a 13 años de edad del 0% (Zanini, 1999).

En las Islas Malvinas, en 1993 la prevalencia en ovinos era de solo el 0.16% y en perros 2.1% (Reichel et al., 1996).

Un resumen de las cifras iniciales de prevalencia y del impacto de los programas de control se presenta en Tabla 1.

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías para el control de la equinococosis quística.

Una vacuna experimental recombinante obtenida de oncósferas del parásito, denominada EG95, protege a los ovinos contra primoinfecciones e infecciones repetitivas por E.G., alcanzando en modelos experimentales (Heath et al. 2003) 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 et al., 1999; Heath et al., 2003).

Con relación a la desparasitación sistemática canina, no se han desarrollado nuevas drogas luego del praziquantel, aunque la información disponible permite estimar ahora que intervalos de tratamientos más prolongados (hasta cada 12 semanas) podrían ser efectivos en llevar el parásito hacia la extinción (Cabrera et al., 2002).

Tabla 1: Estudios epidemiológicos de base y de impacto en diferentes programas control de América del Sur.

Región	Estudios de base	Estudios de impacto	Estudios de impacto
Brasil (Río Grande)	1983 (1)	-	1998 (14)
Perros (%)	28.3		
Ovinos (%)	26		30.2
Casos (n°)	45		28
Screening (%)	1.7		
Perú (Sierra Central)	1992		2002 (3, 4)
Perros (%)	(1,2)		51-79
Ovinos (%)	26		38
Casos (n°)	26.7		2000
Screening (%)	600		5.1 (US)
	5.7 (DD5)		, , ,
Uruguay	1991 (1)	1994 (5)	1997/8 (6, 7)
Perros (%)	10.1	, , ,	0.7
Ovinos (%)	41	16.1	8.5
Casos (x100000)	12.4	9	6.5
Screening (%)			0.04 (EIE**)
Argentina(Río Negro)	1980 (8)	1998 (8)	2003 (9)
Perros (%)	41	2.9	2.5
Ovinos (%)	61	18	
Casos (x100000)	79	22	
Screening (%)	2 (DD5) /	1.6 (US**)	0.4 (US**)
	5(US**)	, ,	, ,

Argentina (Tierra del	1980 (10)	1985 (11)	2001(11)
Fuego)			
Perros (%)	36	27	2.5
Ovinos (%)	52	20	2.5
Casos (x100000)			3.1
Screening (%)			0.2 (US**)
Chile(Región XI-XII)	1979 (1)	1991 (12)	2003 (13)
Perros (%)	54-71	6.5-5.4	?
Ovinos (%)	80-60	36.1-7	?-17.2
Casos (x100000)	38-80		?-42.6
Screening (%)			

Perros: encuestas con bromhidrato de arecolina o coproantígenos. Ovinos: encuestas en salas de faena. Casos humanos: registros del sistema de salud

Screening: encuestas en población con ultrasonografía (US) o DD5 o Elisa

**: Estudios en población escolar

1: (Vidal et al., 1990; Ruiz et al., 1994; Cabrera et al., 1995; Moro et al., 1999; Zanini, 1999; Larrieu et al., 2000; Dueger et al., 2001; Economides et al., 2001; Zanini, 2002; Larrieu et al.2003)

Programa de Control en Río Negro:

Las actividades desarrolladas en el programa de control, vigente hoy en Río Negro se basan en la desparasitación de perros con praziquantel (droga tenicida no ovicida) a la dosis de 5 mg/kg cada seis semanas (a los efectos de eliminar la biomasa parasitaria durante el período prepatente), educación para la salud, control de la faena para garantizar el no acceso de perros a vísceras y legislación para la regulación de las poblaciones caninas y definición de responsabilidades de gobierno y ganaderos.

Vigilancia epidemiológica:

Los sistemas de vigilancia epidemiológica integrados a los programas de control han incluido tradicionalmente:

- Identificación de perros parasitados mediante su dosificación con el tenífugo bromhidrato de arecolina al 1% a la dosis de 4 mg/kg de peso vivo (Schantz, 1973).
- Vigilancia de la infección en el hombre mediante el registro de los casos humanos operados y mediante tamizajes serológicos con doble difusión cinco o enzimoinmunoensayo (Coltorti et al., 1978; Coltorti, 1986).
- Identificación de ovinos parasitados mediante el análisis macroscópico en sala de faena (Larrieu et al., 2001ª; Cabrera et al., 2003).

Las posibilidades actuales, por su parte, incluyen a variadas herramientas:

- Determinación de la tasa de infección en el perro mediante la detección de coproantígenos tanto como técnica de tamizaje (copro EIE) como de confirmación (copro WB) (Craig, 1997; Guarnera et al., 2000), aplicable tanto para la determinación de perros infectados (muestras individuales) como de predios infectados (muestras de materia fecal recogidas del ambiente). Este sistema alcanza una sensibilidad y especificidad del 100% en perros portadores de tenias adultas, utilizando al bromhidrato de arecolina como prueba patrón, mientras que copro WB presenta una sensibilidad del 88% y una especificidad del 100% si copro EIE es utilizado como positivo de referencia (Guarnera et.al, 2000). En muestras obtenidas directamente del ambiente, la sensibilidad y especificidad del copro WB es del 70% y 100% respectivamente (Guarnera et al., 2000).
- Tamizaje ultrasonográfico, disponible para la determinación de la tasa de infección en el hombre, con una sensibilidad y especificidad del 100% y 95.6%, respectivamente (Del Carpio et al., 2000).

Tabla 2: Historia de la prevalencia de Equinococosis en Río Negro (Larrieu et al., 2009).

	1986	1997	2008
Infestación en ovejas (datos de faena)	60%		20%
Infestación en perros (Bromhidrato de arecolina)	41,5%		5%
Casos notificados	38 x 100.000		3,7 x 100.000
Infestación en niños (6 a 14años diagnosticados por ecografía abdominal	5,6 %	1,2%	0,38 %

• Determinación de la infección en el ovino mediante ultrasonografía (Maxon et al., 1996; Guarnera et al., 2001) aunque presenta limitaciones operativas de accesibilidad y equipamiento para su uso sistemático.

En el año 2003 el programa estableció la prevalencia final para la equinococosis canina en base al test de arecolina (5.2% IC95% 3.2-8.1) y procedió a su reemplazo por el uso de coproELISA como prueba tamiz y westernblot (WB) como prueba de confirmación (Guarnera et al., 2000; Cavagion et al., 2006; Pérez et al., 2006) efectuado sobre muestras de materia fecal canina recogidas del suelo de cercanías de las viviendas rurales, a las que se denominó Unidad Epidemiológica (UE), seleccionadas en muestreos simples, aleatorios y estadísticamente representativos estableciendo, así, una nueva línea base para el sistema de vigilancia (Pérez et al., 2006). La nueva unidad de observación fue "UE" resultando positivas aquellas con al menos una muestra positiva a coproELISA/WB, expresándose los resultados como UE con al menos una muestra positiva / total de UE estudiadas.

Por sus diferencias epidemiológicas, las UE fueron divididas para los muestreos en establecimientos ganaderos (productor con una superficie predial definida y un número variable de animales) y en comunidades de población originaria (definida como una vivienda de un productor con un número de animales en un territorio predial compartido por varias familias pertenecientes a una comunidad).

La línea base establecida en el período 2003-2004 en la Provincia de Río Negro para coproELISA/WB indicó de 662 muestras de materia fecal canina 37 positivas (5.4%. IC95% 3.0-6.7) extraídas de 236 UE resultando 32 (13.6.7% IC95% 8.0-17.6) con transmisión presente (Pérez et al., 2006)

Históricamente EQ fue una enfermedad altamente endémica en la provincia de Rio Negro, Argentina, instaurándose desde 1980 un programa de control en Rio Negro. El programa ha involucrado visitas a los campos 4 veces por año por Agentes Sanitarios distribuyendo praziquantel a los productores, con instrucciones para tratar a sus perros. Además, los veterinarios del Ministerio de Salud llevaron a cabo estudios de prevalencia en perros y educación sanitaria incluyendo a los escolares.

Se han realizado tamizajes de la población humana por ultrasonido para detectar EQ en forma temprana (Larrieu et al., 2000; Salviti et al., 2015).

El programa ha tenido éxito en la reducción de la incidencia de la EQ en humanos (5.6% a 0,3% en niños de edad escolar) y en perros (41.5% a 2.5%), pero no suficientemente para evitar la transmisión continua del parasito y manteniendo ciertos niveles de incidencia de la enfermedad en humanos (Larrieu et al., 2011,2012; Salviti et al., 2015).

La vacuna EG95 para ovinos se ha desarrollado como una nueva herramienta para ayudar en el control de la transmisión de *E. granulosus*. La vacuna es altamente efectiva en la reducción de EQ en ovejas expuestas a la infección experimental con *E. granulosus*. (Lightowlers, 2006; Gauci et al., 2011).

La evidencia de inmunidad inducida por la vacuna con anticuerpos séricos, indica que estos, juegan un papel significativo en la inmunidad a los cestodos taenidae, que es creada por anticuerpos oncosfèricos. Otras pruebas que indican la función de los anticuerpos fijadores del complemento en la inmunidad estimulada por las vacunas del antígeno de la oncòsfera recombinante, incluyendo el EG95, provienen de ensayos *in vitro* de muerte de la oncosfera. En los cuales los parásitos mueren en cultivo de suero

de animales vacunados. Se ha encontrado una clara asociación entre la presencia de anticuerpos específicos inducida por la vacuna EG95 y la protección contra la infección en ovejas. Se dispone de pocos datos sobre el uso de la vacuna EG95 en situaciones de campo y la inducción de niveles protectores de anticuerpos mediante la vacunación EG95.

El ministerio de salud en Rio Negro se comprometió a probar la introducción de la vacunación EG95 en corderos como un complemento a su actual programa de control QH. El programa de vacunación comenzó en diciembre de 2009.

La primera evaluación del impacto se realizó utilizando métodos serológicos en 2012. Esta evaluación inicial se realizó con 275 ovejas de dos años de edad basada en ELISA/WB. Se determinó que doce de los 154 animales vacunados eran positivos (7.8%) mientras que en el área testigo 33 de 84 ovejas se encontraron positivas (38.3%), siendo las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Se realizó una segunda evaluación del impacto mediante necropsia en ovejas viejas en 2015. Las ovejas vacunadas tuvieron una disminución significativa de la prevalencia de infección por *E. granulosus* 21.1% en 2015 en comparación con 56.3% en 2009 (P=0.03), aunque los resultados hallados en un modelo extensivo a campo están lejos de la protección alcanzada en modelos experimentales a corral.

En relación con el número y el tamaño de los quistes hidatídicos, 1.5 quistes por animal se encontraron en la zona testigo mientras que 0.3 quistes fueron encontrados por cada animal infectado en el área donde se aplicó la vacuna, después de 5 años de programa (Larrieu et al, 2015). Todos los quistes hallados fueron pequeños, menores a 1 cm y uno solo fue viable. El ensayo demostró que la vacuna EG95 es una valiosa herramienta para ayudar a reducir la transmisión de EG.

Hay poca información sobre la respuesta humoral y la longevidad de la inmunidad contra EG en ovejas inducida por la vacuna EG95 (Poggio et al, 2016) No se ha informado sobre las respuestas a la vacuna en condiciones de campo en un programa de control. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta humoral y su evolución a lo largo del tiempo, en ovinos vacunados con EG95 bajo condiciones de campo en el programa de control de Rio Negro.

OBJETIVO

Evaluar la respuesta humoral y su evolución a lo largo del tiempo, en ovinos vacunados con EG95 bajo condiciones de campo.

Capitulo II Materiales y métodos:

Área de trabajo:

El área de trabajo abarca una zona de vacunación comprendida por los siguientes parajes: Anecón Grande (lat: -41.3215 long -70.2742), Rio Chico Abajo (lat. -41.7098 long-70.4761) Mamuel Choique, Nahuel Pan y una región de control sin vacunación integrada por: Blancura Centro (lat.-40.4238-long -69.6146) y Lipetren, ubicadas en la provincia de Río Negro, Argentina, con un área total de 5820 Km².

Hay cinco centros de salud en el área de trabajo designada. En cada uno de ellos trabaja un agente sanitario responsable del primer contacto del sistema de salud con el productor. En estas áreas, al inicio del programa, existían 16.511 ovejas y 4.696 corderos, de los cuales 9.383 ovejas y 3.146 corderos estaban en la zona de vacunación y 7.128 ovejas y 1.550 corderos estaban en la zona control, con un rango de 10 a 200 animales por productor. Es común que los campos no estén subdivididos con alambrados, dando por resultado movimientos transfronterizos de ovejas y de perros.

Vacunación:

Para la vacunación se utilizó la vacuna EG95 liofilizada y suministrada completa (incluyendo el adyuvante Quil A) en viales que contienen 50 o 100 dosis, producida por la Universidad de Melbourne (Gauci et al., 2015). La vacuna se rehidrató con agua destilada estéril en la mañana del día de uso. Un ml de vacuna reconstituida que contenía 50 μg y 1 mg de Quil A se inyectó subcutáneamente en el cuello (Lightowlers et al., 1999). Las actividades de vacunación comenzaron en el mes de diciembre de 2009.

Todos los animales vacunados fueron identificados con una caravana de color diferente para cada año del proyecto: amarillo (YT) en el primer año y sucesivamente blanco (WT), rojo (TR), verde (GT), azul (BUT) negro (BKT). Los animales no fueron identificados individualmente, por lo tanto, un animal con caravana es un animal que recibió al menos una dosis de vacuna (tabla 3). El esquema de vacunación fue de dos dosis de vacuna en corderos jóvenes. Aplicadas cada treinta días, más una inyección de refuerzo única cuando los animales tenían un año de edad.

El número de dosis de vacuna empleadas fue de 21.447 en seis cohortes anuales de corderos. De estos, 6.431 dosis fueron colocadas en corderos con una caravana amarilla (YT) en el primer año, y sucesivamente 4.449 en corderos con caravana blanca (WT), 1.949 caravanas rojas (TR), 2.562 verdes (GT), 3.001 caravanas azules (BUT) Y 2.865 caravanas negras (BKT) en el último año (Paykari et al.,2008). Durante el tercer año de actividades, la erupción del Volcán Puyehue en Chile, afectó el programa. La ceniza que cayó sobre el área de trabajo condujo a la muerte de muchos animales.

Obtención de muestras:

En el sexto año del programa, en la región de vacunación de cada campo se seleccionaron 2 ovejas de cada caravana de color al azar (las primeras 2 capturadas en el corral), excepto en el primer grupo vacunado (YT) donde se eligieron 8 ovejas. En la región de control sin vacunación, la selección de animales para el muestreo de sangre fue similar, implicando la selección de 3 cohortes de ovejas de edades similares a las de los grupos vacunados (cordero, 3-4 años, oveja vieja). Los sueros también se obtuvieron de un grupo adicional de corderos de control que se derivaron de un área conocida por no ser endémica para la equinococosis (Puerto Madryn, Argentina) (total de 4 grupos de control). Se obtuvieron 10 ml de muestra de sangre de punción yugular. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener suero y se mantuvieron a 5°C antes de enviarlas al laboratorio donde las muestras se mantuvieron a -20°C.

Laboratorio:

Las respuestas de anticuerpos específicos anti EG95 se evaluaron en muestras de suero de 341 animales. De éstos, 178 pertenecían al grupo vacunado y 163 correspondían a los grupos control no vacunados (tabla 3).

Las respuestas anti-EG95 se determinaron usando procedimientos similares a los descriptos por (Heath et al., 2012; Poggio et al., 2016). En resumen, el antígeno EG95 para ELISA se preparó expresando EG95-6HIS en E. coli y purificando la construcción con Protino Ni-TED / IDA (Macherey-Nagel, Duren, Alemania). Se determinaron las concentraciones óptimas de antígeno y conjugado usando titulaciones de tableros de análisis de sueros positivos y negativos. Se añadió un volumen de 50 µl de EG95-6HIS a 1 µg / ml en tampón de recubrimiento a cada pocillo de ensayo de placas de ELISA de Nunc Inmunosorb y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Las placas se lavaron y se bloquearon con 300 µl / pocillo de solución de bloqueo (900 µl de solución salina tamponada con fosfato, 100 ml de suero de caballo adulto, 1% de rojo de fenol) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sueros se ensavaron en solución de bloqueo a una dilución de 1: 200. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 100 µl de IgG anti-oveja de burro conjugada con peroxidasa de rábano (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA.), 1: 3000 en solución de bloqueo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar las placas, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) 0,5 mg/ml en tampón fosfato citrato 70 mi, pH 4,2). Las placas se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos, se detuvieron mediante la adición de 50 µl de fluoruro de sodio al 2% y las placas se leyeron posteriormente a 405 nm utilizando un lector de placas ELISA automatizado.

Análisis estadístico:

El nivel específico de IgG EG95 en muestras de suero de grupos vacunados y no vacunados se expresó como el valor medio de la densidad óptica (DO) a 405 nm más la desviación estándar.

Se utilizaron análisis de ANOVA unidireccional (análisis de varianza) para comparar los valores de ELISA DO entre 6 cohortes diferentes de ovinos vacunados y 4 no vacunados, así como pruebas de Fisher y Tukey post ANOVA.

Se utilizó la prueba t de Student para comparar los valores medios de absorbencia entre los ovinos vacunados y no vacunados. Todas las pruebas se realizaron utilizando MINITAB 16.

Declaración de ética:

En cuanto a las preocupaciones éticas en torno al protocolo de tratamiento de ovejas utilizadas en este estudio, los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de La Pampa. El estudio se realizó siguiendo las normas del Servicio Nacional de Sanidad Animal relativas al bienestar de los animales.

Capitulo III Resultados:

En la Figura 5 se muestran los valores medios de la absorbencia de ELISA y las desviaciones estándar de todos los grupos de ovejas vacunadas (promedio 0.76 ± 0.33) y no vacunadas (promedio de 0.24 ± 0.12). El análisis de la prueba t de Student indicó diferencias significativas entre los valores de DO405nm entre ovinos inmunizados con EG95 y las ovejas no vacunadas (p <0.0001). También se evidenciaron diferencias significativas en el análisis de ANOVA, en los valores de DO405nm cuando se compararon las 4 cohortes de animales no vacunados y las 6 cohortes de ovinos vacunados (F = 75.5, R2 67.3, p <0.001). ANOVA también demostró diferencias significativas en los valores de DO405nm cuando sólo se consideraron las 6 cohortes de ovinos vacunados (F = 17.8, p <0.001).

El análisis post ANOVA, por su parte, no reveló diferencias significativas entre animales no vacunados de diferentes edades, sin embargo, las diferencias entre los grupos vacunados y no vacunados fueron evidentes, así como algunas variaciones entre los grupos de animales vacunados con el tiempo.

Las respuestas de IgG específicas a la vacunación con EG95 se muestran en la Figura 1 como los valores medios de DO_{405nm} con IC del 95% en grupos vacunados con EG95 (n = 178) y ovejas no vacunadas de similar edad (n = 163). Se indujo una respuesta de anticuerpo anti-EG95 en todos los grupos de ovinos inmunizados, 4 veces más alta (0,828) que la media observada en los grupos de control (0,218). Se detectó un mayor grado de dispersión entre los valores más extremos dentro del conjunto de datos de ovinos vacunados en comparación con los grupos de control no vacunados que muestran una menor variabilidad (Figura 1). Las respuestas de anticuerpo EG95 en ovejas de diferentes cohortes no inmunizadas y vacunados se muestran en la Figura 2 y revelan el aumento sostenido en la respuesta observada en animales después de la tercera inmunización.



FIGURA Nº1

Cordero caravaneado

FIGURA Nº 2





Evaluación macroscópica de vísceras rojas

FIGURA Na 3

FIGURA Nº 4

Capitulo IV Discusión:

Los datos descriptos aquí indican que después de la tercera vacunación con la vacuna EG95, a un año de edad, las respuestas de IgG específicas detectadas en el suero de ovejas aumentaron a un nivel mayor que las observadas después de la segunda inmunización y que esta respuesta se mantuvo longitudinalmente a lo largo del tiempo, por lo menos 5 años. La protección contra la infección proporcionada por la vacunación ha sido detallada por Larrieu et al., (2013) Se encontraron cuatro ovejas en el grupo YT con seis quistes hidatídicos, todos ellos pequeños (1x1, 3 cm a 0,2x0, 2 cm). De estos, 2 se encontraron en el hígado (fértiles) y 4 en el pulmón (0,3 quistes promedio por animal). En 13 animales no vacunados, se detectaron 47 quistes hidatídicos (1,4 quistes por animal), algunos mayores a 5 cm. Una diferencia estadísticamente significativa se demostró en el número de quistes encontrados en ovinos del grupo control y el grupo vacunado (p=0,02) (Larrieu et al., 2013). Estos datos respaldan resultados previos que sugieren que la vacuna EG95 es adecuada como una medida de control eficaz para reducir el nivel de transmisión de E. granulosus en ovejas y que probablemente se refleje en una menor prevalencia de infección humana (Heath et al., 2003; Larrieu et al., 2013; 2015).

En una revisión, (Heath et al., 2003) hacen referencia a un ensayo de seguridad y eficacia de la vacuna EG95 que involucra a 50.000 y 100.000 corderos en las provincias de Qinghai y Xinjiang de China. Se aplicaron dos inyecciones que indujeron un alto nivel de anticuerpos y que protegieron a los animales en un 85% frente a un desafío natural. Estos permanecieron 12 meses en el suero de los animales vacunados generando protección a la infección parasitaria. Después de una tercera inyección administrada de 6 a 12 meses después de la segunda vacunación, se indujo un nivel más alto de anticuerpos y se alcanzó hasta el 100% de protección. Estos datos son coincidentes con nuestros resultados, de aquí que las respuestas serológicas específicas a la vacunación pueden ser detectadas al menos un año después de dos inmunizaciones en corderos y que las respuestas aumentaron, a raíz de una tercera inmunización de los animales al año de edad.

Heath y Koolaard, (2012), presentaron pruebas que apoyan una asociación directa entre el título de anticuerpos anti-EG95 y el nivel de protección contra una infección experimental con *E. granulosus*.

En el ensayo utilizado por Heath y Koolaard, (2012), un nivel específico anti-EG95 a 1:400 de dilución a DO 405 nm indicó un nivel de protección de 1.0. (Poggio et al., 2016), identificaron un nivel similar de protección asociado a animales que tenían a DO405 nm mayor a 1.0 y un nivel de protección reducido (84%) en animales que tenían niveles más bajos de anticuerpos (alrededor de 0,7). En este trabajo hemos identificado las respuestas de anticuerpos específicos en ovejas después de 3 dosis de la vacuna EG95 en condiciones de campo y en un programa de control que se corresponden con los niveles mostrados anteriormente para ser protector contra infecciones por desafío experimental (Poggio et al., 2016).

Las comunidades nativas donde se llevó a cabo este programa de control son remotas y tienen una infraestructura rudimentaria. En muchos casos tampoco era posible que los productores tuvieran todos sus animales disponibles para las vacunaciones cuando debían hacerlo. Por esta razón, algunos animales pueden haberse perdido una o más de sus dosis programadas. Las faltas de fiabilidad en el hecho de poder administrar inmunizaciones a animales individuales probablemente contribuyeron a la variabilidad en las respuestas de anticuerpos individuales observadas y probablemente también contribuyeron en el nivel de protección más bajo observado en el ensayo de campo en comparación con los resultados después de la infección con desafío experimental en ovinos vacunados (Poggio et al., 2016).

Este ensayo se realizó utilizando procedimientos aplicables si la vacuna EG95 se implementara como un procedimiento de rutina para la prevención continua de la transmisión de *E. granulosus*. En tales circunstancias, no se esperaría que los animales fueran identificables individualmente, y algunos animales pueden no recibir a uno o más de sus vacunaciones.

En el ensayo de campo descripto aquí, se observó una reducción de los anticuerpos anti-EG95 específicos en los 3º y 4º años del estudio (figura 6) coincidiendo con el período posterior a la erupción del volcán Puyehue en Chile que produjo desnutrición y mortalidad animal.

Se necesita más información para determinar si sería acertado aplicar una nueva vacuna de refuerzo en animales durante su cuarto o quinto año de vida, con el fin de proporcionar protección a los que sobrevivieron más allá de esta edad.

Figura 5. Mediana, rango intercuartil y el rango del suero de IgG específico anti-EG95

Respuestas del anticuerpo (OD) medición en EG95 vacunados y no vacunados ovejas en 2015, en la provincia de Negro, Argentina.

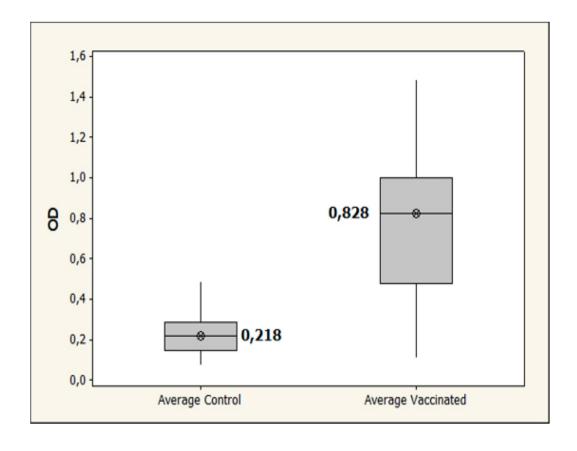


Figura 6. Mediana, rango intercuartil y el rango del suero de IgG específico anti-EG95

Respuestas del anticuerpo (OD) medición en diferentes cohortes de la vacuna EG95 y

Ovejas no vacunadas en 2015 en la provincia de Negro, Argentina.

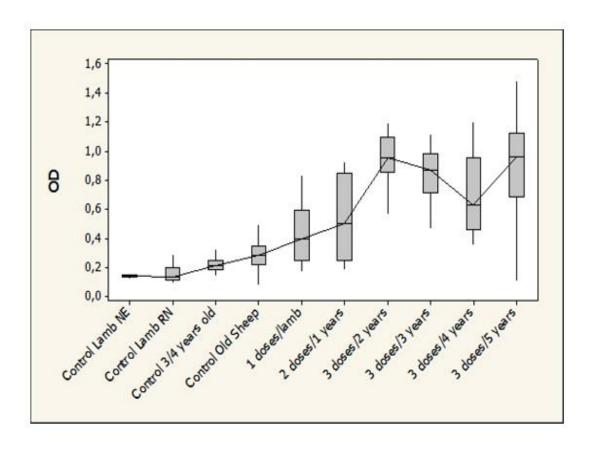


Tabla 3: Características de los no vacunados y ovejas vacunadas con EG95 entre 2009 Y 2015, en la Provincia de Río Negro, Argentina en 2015.-

Ovejas cohortes (caravana código**	muestras de sangre en 2015	Edad en el 2015	Vacuna ción en 2015	Observación	Acción
vacunados (YT)	89	5/6 años	3	dic.2009 1° cord. Vacunados YT*	2009 diagnóstico inicial (Larrieu et al,2013)
Vacunados (RT)	13	4 años	3	dic.2010 1ª cord vacunados RT*	
Vacunados (BUT)	15	3 años	3	dic.2011 1° cord Vacunados BUT*	
Vacunados(GT)	14	2 años	3	dic.2012 1° cord vacunados GT*	2012 1º estudio de impacto (Larrieu et al,2013)
Vacunados (WT)	12	1 año	2	dic.2013 1° cord vacunados WT*	
Vacunados (BKT))	35	60 días	1	dic.2014 1° cord vacunados BKT8	
Total, vacunados ***	178				2015segundo estudio de impacto y evaluación de anticuerpos específicos en todo el grupo vacunado
Control de ovejas viejas	81	5 /6 años	0	area de trabajo	
Control de ovejas	25	3/4 años	0	area de trabajo	
Cordero de Control	47	30/60 dí	0	area de trabajo	
Control cordero NE	10	30 días	0	Área no endémica	
Total Vacunados ** **	163				2015 evaluación de anticuerpos específicos EG95, respuesta en no todo el grupo vacunado

TOTAL 341

- 4 * Edad de vacunación: 30, 60 y 365 días en primera, segunda y tercera dosis respectivamente
- 5 ** Numero de caravana: BKT (negro), WT (blanco), GT (verde), BUE (azul), RT (rojo), YT (amarillo)
- 6*** ovejas de río Chico Abajo, Anecon Grande, Mamuel Choique **** ovejas de Blancura Centro y
- 7 Puerto Madryn

Capítulo V Bibliografía:

Ammann R.; Eckert J., (1995). Clincal diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. In The biology of Echinococcus granulosus and hydatid disease (Thompson, R., Lymbery, J.: 411-477). George Allen and Unwin. London.

Boufana B.S.; Campos-Ponce M.; Naidich A.; Buishi I.; Lahmar S.; Zeyhle E.; et al. (2008) Evaluation of Three PCR Assays for the Identification of the Sheep Strain (Genotype 1) of Echinococcus granulosus in Canid Feces and Parasite Tissues. Am J Trop Med Hyg (2008); 78(5):777-783.

Budke C. M, Deplazes, P.R. (2008). Global socioeconomicimpact of cystic echinococcosis. Emerg. Infect. Dis. 12, pp, 296-303Cabrera, 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.

Cabrera, P.; Parietti, S.; Haran, G.; Benavidez, S.; Lloyd, S.; Perera, G.; et al. (1996a). Rates of reinfection with Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena, Taenia ovis and other cestodes in a rural dog population in Uruguay. Int. J. Parasitol. 28:79-83.

Cabrera, P.: Lloyd, S.; Haran, G.; Pineyro, L.; Parietti, S.; Gemmel, M.; et al. (2002). Control of Echinococcus granulosus in Uruguay: evaluation of different treatment intervals for dogs. Vet. Parasitol. 103:333-340.

Campos-Buenos, A.; Lopez-Abente, G.; Andres-Cedrcadillo, A; (2000). Risk factors for Echinococcus granulosus infection: a case-control study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62:329-332.

Carmona, C.; Perdomo, R.; Carbo, A.; Alvarez, C.; Monti, J.; Graubert, D.; et al. (1998). Risk factors associated with human cyst Echinoccoccosis in Florida, Uruguay: results of a mass screening study using ultrasound and serology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58: 000-000.

Cavagion, L.; Alvarez, R.; Larrieu, E. (2002). Diagnóstico histológico del quiste hidatídico ovino y su aplicación a la evaluación de programas de control. Situación de la hidatidosis echinococcosis en la República Argentina (Denegri, G., Elissondo, C., Dapcich, M) 121-132. AAPAVET, Argentina.

Cavagión, L.; Perez, A.; Santillan, G.; Zanini, F.; Jensen, O.; Saldias, L.; et al. (2005). Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. Vet Parasitol 128:73-81.

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.

Coltorti, E. (1986). Standarization and evaluation of an Enzymeimmunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:1000-1005.

- Cohen, H.; Paolillo, E.; Bonifacino, R.; Botta, B.; Parada, L.; Cabrera, P.; et al. (1998). Human cystic echinococcosis in a Uruguayan community: a sonogrraphic, serologic and epidemiologic study. Am. Trop. Med. Hyg. 59:620-627.
- Craig P. (1997). 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.
- Gauci.C.; Jenkins.D; Lightowlers.M.W.; (2011) Strategies for optimal expression of vaccine antigens from taeniid cestode parasites in Escherichia coli. Mol. Biotechnol. 48 pp. 277-289.
- 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 an apparently health population. Medicina 60:466-468.
- De Zabaleta, O.; Losada, C.; Galardi, M. (1986). Epidemiología y control de la hidatidosis en Neuquen 1970-1985. Subsecretaría de Salud de Neuquén, mimeo.
- Demirbilek, S.; Sander, H.; At yurt, H.; Aydin, G. (2001). Hydatid disease of the liver in childhood: the success of medical therapy and surgical alternatives. Pediatr. Surg. Int. 17:373-377.
- 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.
- Eckert, J.; Thompson. R. (1997). Intraespecific variation of Echinococcus granulosus and related species with emphasis on their infectivity to humans. Acta Tropica 64:19-34.
- Eckert, J.; Deplazes, P.; Craig, P.; Gemmel, M.; Gottstein, B.; Heath, D.; et al. (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.
- Economides, P.; Larrieu, E.; Orlando, D. (2001). Evolution of programmes for control of Echinococcus grabulosus in Humans and Animals: a public health problem of global concern. (Eckert, J., Gemmed, M., Meslin, F., Pawlowski, Z.) 204-209 WHO/OIE. France.
- Frider, B.; Losada. C.; Larrieu, E.; De Zavaleta, O. (1988). Asymptomatic abdominal hydatidosis detected by ultrasonography. Acta. Radiol. 29: 431-434.
- Frider, B.; Larrieu. E.; Odrizola. M. (1999). Long term outcome of asymptomatic liver hydatidosis. J. Hepatol. 30:228-231.
- Frider, B.; Moguilensky, J.; Salvitti, J.; Odriozola, M.; Cantoni, G.; Larrieu, E. (2001). Epidemiological surveillance of human hydatidosis by means of ultrasonography: its controbutions to the evaluation of control programs. Acta Tropica 79:219-223.

- Gemmel, M.; Lawson, R.; Robertson, M. (1986). Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: biological parameters of Echinococcus granulosus in dogs and sheep. Parasitology 92:599-620.
- Gemmel M.; Lawson J. (1995). 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.
- 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.
- Guarnera, E.; Santillan, G.; Botticelli, R.; Franco, A. (2000). Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. Vet. Parasitol. 88:131.
- Guarnera, E.; Zanzottera, E.; Pereyra, H.; Franco, A. (2001). Ultrasonographic diagnosis of ovine cystic echinococcosis. Vet. Radiol. Ultrasound. 42:352-354.
- Guarnera, E.; Zanzottera, E.; Pereyra, H.; Franco, A. (2002). Ultrasonografía: su aplicación en el control de la hidatidosis. Rev.Med.Vet. 6:424-427.
- Gusbi, A.; Awan, A. (1991). Experimental infection of Libyan sheep with Echinococcus granulosus. Ann. Trop. Med. Parasitol. 4:433-437.
- Heath, D.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.
- Heath, D.D.; J. Koolaard, (2012) Serological monitoring of protection of sheep against Echinococcus granulosus induced by the EG95 vaccine. Parasite Immunol. 34PP. 40-4.
- Kamenetzky, L.; Gutierrez, A.; Canova, S.; Haag, K.; Guarnera, E.; Parra, A.; et al. (2002). Severasl strains of Echinococcus granulousus infect livestock and humans in Argentina. Infect. Gen. Evolution 2:129-1346.
- Larrieu, E.; Costa, M.T.; Cantoni, G.; Labanchi, J.; Bigatti, R.; Araya, D.; et al. (1999). Rate of infection and of reinfection by Echinococcus granulosus in rural dogs of the Province of Rio Negro. Vet. Parasitol. 87: 281-286.
- Larrieu.E.; Costa,M.T.; Cantoni.G.; Labanchi,J.L; Bigatti, R.; et al (2000),Control program of hydatid disease in the province of Rio Negro Argentina. 1980-1997. Bol. Chil. Parasitol. 55 pp. 49-53.
- Larrieu, E.; Frider, B.; Salvitti, J.; Mercapide, C.; Del Carpio, M.; Costa, M.; et al. (2000b). Portadores Asintomáticos de Hidatidosis: Epidemiología, Diagnóstico y Tratamiento. Rev. Panam. Salud Pública 79: 250-256.
- Larrieu, E.; Mercapide, G.; Del Carpio, M.; Salvitti, J.; Costa, M.T.; Romeo, S.; et al. (2000c). 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.

- Larrieu, E.; Costa, M.; Cantoni, G.; Alvarez, R.; Cavagion, L.; Labanchi, J.; et al. (2001a). Ovine Echinococcus granulosus transmission dynamics in the province of Rio Negro, Argentina, 1980-1999. Vet. Parasitol. 98:263-272.
- Larrieu, E.; Frider, B. (2001b). Human cystic echinococcosis: contributions to the natural history of the disease. Ann. Trop. Med. Parasitol. 7:679-687.
- Larrieu, E.; Del Carpio, M.; Costa, M.; Yadon, Z. (2002). Risks factors for hydatidosis in children of Rio Negro Province. A study of cases and control. Ann. Trop. Med. Parasitol. 96:43-52.
- Larrieu, E., Del Carpio, M., Salvitti, J., Mercapide, C., Panomarenko, J.; Costa, M.; et al. 2003. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis humana en población escolar. Informe preliminar. Rev. Arg. Pediat. 100:448-455.
- Larrieu, E.; Del Carpio, M.; Salvitti, J.; Mercapide, C.; Sustersic, J.; Panomarenko, J.; et al. (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.
- Larrieu, E.; Alvarez, A.R.; Gatti, A.; Mancini, S.; Bigatti, R.; Araya, D.; et al. (2009). Fisiopatologia y respuesta inmune en ovinos infectados experimentalmente con Echinococcus granulosus. Medicina (B Aires). 2009; 69(3):341-6.
- Larrieu, E.; Del Carpio M.; Mercapide C.; Salvitti J.C.; Sustercic J.; Moguilensky J.; et al. (2011). Programme for ultrasound diagnoses and treatment with albendazole of cystic echinococcosis in asymptomatic carriers: 10 years of follow-up of cases. Acta Tropica 117 (2011) 1–5.
- Larrieu.E.; Del Carpio.M.; Mercapide.C.; Salvitti.J.C.; Sustercic.J.; et al. (2011) Programme for ultrasound diagnoses and treatment with albendazole of cystic echinococcosis in asymptomatic carriers: 10 years of follow-up of cases. Acta Trop. 117 pp. 1-5.
- Larrieu, E. Zanini, F. (2012) Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. Pan Am. J. Public Health. 31:81-87.
- Larrieu.E.; Herrero.E; Mujica.G.; Labanchi.J.L.; Araya.D. et al. (2013) Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Early impact and preliminary data. Acta Trop. 127 pp. 143:151.
- Larrieu.E.; Mujica.G.; Gaucci.C.G; Vizcaychipi.K.; Poggio.T.V.; et al. (2015) Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: second study of impact. PLOS Neg. Trop. Dis. e0004134 pp. 1:10.
- Lightowlers, M.; Jensen, O.; Fernandez, E.; Iriarte, J.; Wolllard, D.; et al. (2001) Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int. J. Parasitol. 29:531-534.
- Lightowlers.M.W. D.D. Heath, (2009) Immunity and vaccine control of Echinococcus granulosus infection in animal intermediate hosts. Parassitologia 46 pp. 27–31.

Lightowlers.M.W. (2006) Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. Parasitology 133 pp. 27-42.

Lightowlers.M.W: Jensen.O; Fernandez.E; J. Iriarte, J.D. Woollard A.;et al. (1999) Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int. J. Parasitol. 29 pp. 531-534.

Maxon, 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.

Moro, P.; Bonifacio, N.; Gilman, R.; Lopera, L.; Silva, B.; et al. (1985) Field diagnosis of Echinococcus granulosus infection among intermediate and definitive hosts in an endemic focus of human cystic echinococcosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 91:611-615.

Nahmias, J.; Goldsmith, R.; Soibelman, M.; El On, J. (1994). Three to 7 years followp up after albendazol treatment of 68 patients with cystic echinococcosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 88:295-304.

Pavletic.C.F; Larrieu.E; Guarnera.E; Casas.N; Irabedra.P. et al., (2016) Cystic echinococcosis in South America: a call for action Pan Am. J. Public Healthin press.

Paykari, H.; Heath, D.D.; Dalimi, G.R.; Karimi, G.R.; Motamedi, A.; (2008) Experimental vaccination of sheep against hydatid cyst using EG95 recombinant vaccine. Arch. Razi. Inst. 63) pp. 29–34.

Pelaez, V.; Kugler, C.; Correa, D.; Del Carpio, M.; Guangiroli, M.; Molina, J.; et al. (2000). Pair as percutaneus tretament of hydatid liver cystis. Acta Trópica 75:197-202.

Perez, A.; Costa, M.T.; Cantoni, G.; Mancini, S.; Mercapide, C; Herrero, E.; Volpe, M.; Araya D.; Talmon, G.; Chioso, C.; Vazquez, G.; Del Carpio, M.; Santillan, G.; Larrieu E. (2006). Vigilancia epidemiologica de la echinococcosis quistica en perros, establecimientos ganaderos y poblaciones humanas de la Provincia de Rio Negro.

Poggio.T.V.; Jensen.O.; Mossello.M.; Iriarte.J.; Avila.H.G. et al. (2016) Parasite Immunol. doi: 10.1111/pim.12325. [Epub ahead of print].

Ramachandran, C.; Deep, G.; Vijay, A. (2001). Laparoscopic surgery in hepatic hydatid cysts: a technical improvement. Surg. Laparosc. Endosc. 11:14-18.

Reichel, M.; Baber, D.; Craig, P.; Gasser, R. (1996). Cystic echinococcosis in the Falkland Islands. Prev. Med. Vet. 7.7:115-123.

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.

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.

Salviti.J.C; Sobrino.M.; Del Carpio.M.; Mercapide.C.; Uchiumi.L.C.; et.al. (2015) Hydatidosis: Ultrasonographyc screening in the Río Negro Province 25 years after the first screening. Acta Gastroenterol. Latinoam. 44 pp. 311-315.

Schantz P. (1973). Guía para el empleo de bromhidrato de arecolina en el diagnóstico de la infección por Echinococcus granulosus. Bol. Chilen. Parasitol. 28:81-90.

Schantz, P.; Collie, C.; Cruz Reyes, A.; Prezioso U. (1976). Sylvatic echinococcosis in Argentina. Tropenmed. Parasitol. 27:70-78.

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.

Torgerson, P. (2003). Economic effects of echinococcosis. Acta Tropica 85:113-118.

Torgerson, P.; Heath, D. (2003b). Transmission dynamics and control options for Echinococcus granulosus. Acta Tropica 127:143-158.

Thompson, R. Biology and systematics of Echinococcus. (1995). In The biology of Echinococcus granulosus and hydatid disease (Thompson, R., Lymbery, J.) pag 1-50. George Allen and Unwin. London.

Thompson, R.; Mcmanus, D. (2001). Aetiology: parasites and life cycles. In: Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem.

Vidal, M.; Bonilla, S.; Jería E. (1990). Enfoque epidemiológico de los programas de control de la hidatidosis XI y XII Región, Chile. Servicio Agrícolo y Ganadero, 25 pg.

Yildiz, K.; Gurcan, S. (2003). Prevalence of hydatidosis and fertility of hydatid cysts in sheep in kirikkale, Turkey. Acta Veterinaria Hungarica 51:181-187.

Zanini, F. (1999). Perspectivas para la erradicación de la hidatidosis en Tierra del Fuego. Arch. Int. Hidat. 33:19-23.

Declaración de conflicto de intereses:

Todos los autores no tienen ningún conflicto de intereses real o potencial.