

**Las generaciones de las vacunas: Caso de vacunas antiparasitarias
gastrointestinales utilizadas en Medicina Veterinaria**

**The generations of the vaccines: Case of gastrointestinal antiparasitic
vaccines used in Veterinary Medicine**

**As gerações de vacinas: Caso de vacinas antiparasitárias gastrointestinais
utilizadas em Medicina Veterinária**

Prieto Prieto Laura Daniela¹, Vargas Borda Lina Maria¹, Jaramillo Hernández
Dumar Alexander^{2*}

¹ Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos,
Villavicencio, Meta, Colombia.

² MVZ, Esp., MSc., PhD. Profesor de la Escuela de Ciencias Animales.
Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta, Colombia.

dumar.jaramillo@unillanos.edu.co

Recibido 08 de septiembre 2021, aceptado 22 de diciembre 2021

RESUMEN

Las vacunas son el pilar fundamental de la medicina preventiva y la base para posibles planes de control y/o erradicación de enfermedades, especialmente las infecciosas. Los parásitos internos en los animales de producción y de compañía continúan siendo una de las principales amenazas para la salud y el bienestar animal con importantes implicaciones económicas, además de su impacto en la salud pública mundial. Su control se ha basado casi exclusivamente en fármacos quimioterápicos, que desde hace varios años han perdido su eficacia y existen claros ejemplos de resistencia parasitaria a ellos. Hay pocos ejemplos comerciales de vacunas de parásitos gastrointestinales disponibles comercialmente para su uso en la práctica de la Medicina Veterinaria. Esta revisión describe algunos ejemplos comerciales de vacunas gastrointestinales antiparasitarias para su formulación en la práctica médica veterinaria, visto desde la perspectiva de “las generaciones de vacunas” y respaldado por estudios clínicos experimentales de antígenos prometedores para el control profiláctico de ciertos agentes parasitarios gastrointestinales de interés en salud pública principalmente. Hasta la fecha, está

disponible con ciertas limitaciones comerciales en algunos países europeos y oceánicos Barbervax® y en países sudamericanos Providean® Hidatil EG95 para uso en rumiantes para el control de *Haemonchus contortus* y *Echinococcus granulosus*, respectivamente; en algunos países de América y África, Cysvax™ está disponible para el control de *Taenia solium* en cerdos; y en el mundo con muy pocas limitaciones, una serie de vacunas comerciales para el control de la coccidiosis como la *Eimeria* spp. en la industria avícola: pavos, pollos de engorde y gallinas ponedoras (ej: CoggiVac®, Immucox®, Paracox®, entre otros). Existe la necesidad de tener estos tipos de vacunas en todos los países donde estos parásitos gastrointestinales son endémicos y de esta manera brindar opciones para su control, por consiguiente, una serie de inversiones económicas son necesarias para apoyar el desarrollo técnico-científico en torno al desarrollo de nuevos biológicos (nueva generaciones de vacunas) efectivos y seguros para el control de los parásitos internos más relevantes en animales de producción y de compañía.

Palabras claves: Manejo integrado de parásitos internos, salud pública, zoonosis

ABSTRACT

Vaccines are the fundamental pillar of preventive medicine and the basis for possible control and/or eradication of disease plans, especially infectious diseases. Internal parasites in production and companion animals continue to be one of the main threats to animal health and welfare with important economic implications, in addition to its impact on global public health. Its control has been based almost exclusively on chemotherapeutic drugs, which for several years have lost their efficacy and there are clear examples of parasitic resistance to them. Even so, few commercial examples of gastrointestinal parasite vaccines are commercially available for use in the practice of Veterinary Medicine. This review describes some commercial examples of gastrointestinal antiparasitic vaccines for their formulation in veterinary medical practice seen from the perspective of “the

generations of vaccines" and supported by experimental clinical studies of promising antigens for the prophylactic control of certain gastrointestinal parasitic agents of interest in public health mainly. To date, it is available with certain commercial limitations in some European and Australian countries Barbervax® and in South American countries Providean® Hidatil EG95 for use in ruminants for the control of *Haemonchus contortus* and *Echinococcus granulosus*, respectively; in some countries in America and Africa, Cysvax™ is available for the control of *Taenia solium* in pigs and in the world with very few limitations, a series of commercial vaccines for the control of coccidiosis (*Eimeria* spp.) in poultry industry: turkeys, broilers and laying hens (e.g., CocciVac®, Immucox®, Paracox®, among others). There is a need to provide this type of vaccine to all countries where these gastrointestinal parasites are endemic and, in this way, provide options for their control. As well as a series of economic investments is highly necessary to support technical-scientific development around development of new effective and safe biologicals (new generations of vaccines) for the control of the most relevant internal parasites in production and companion animals.

Keywords: Internal parasite management, public health, zoonose.

RESUMO

As vacinas são o pilar fundamental da medicina preventiva e a base para possíveis planos de controle e/ou erradicação de doenças, principalmente as infecciosas. Os parasitas internos em animais de produção e de companhia continuam sendo uma das principais ameaças à saúde e bem-estar animal, com implicações econômicas significativas, além de seu impacto na saúde pública global. Seu controle tem sido baseado quase exclusivamente em drogas quimioterápicas, que perderam sua eficácia há vários anos e há exemplos claros de resistência parasitária a elas. Existem poucos exemplos comerciais de vacinas contra parasitas gastrointestinais disponíveis comercialmente para uso na prática da Medicina Veterinária. Esta revisão descreve alguns exemplos comerciais de

vacinas antiparasitárias gastrointestinais para formulação na prática médica veterinária, vistas sob a ótica das "gerações de vacinas" e apoiadas por estudos clínicos experimentais de antígenos promissores para o controle profilático de certos agentes parasitários gastrointestinais de interesse. saúde. Até o momento, Barbervax® está disponível com certas limitações comerciais em alguns países europeus e oceânicos e na América do Sul Providean® Hidatil EG95 para uso em ruminantes para o controle de *Haemonchus contortus* e *Echinococcus granulosus*, respectivamente; em alguns países da América e África, Cysvax™ está disponível para o controle de *Taenia solium* em suínos; e no mundo com pouquíssimas limitações, uma série de vacinas comerciais para o controle da coccidiose como a *Eimeria* spp. na avicultura: perus, frangos de corte e galinhas poedeiras (ex: CoggiVac®, Immucox®, Paracox®, entre outros). Há a necessidade de ter esses tipos de vacinas em todos os países onde esses parasitas gastrointestinais são endêmicos e assim oferecer opções para o seu controle, portanto, uma série de investimentos econômicos são necessários para apoiar o desenvolvimento técnico-científico em torno do desenvolvimento de novas vacinas eficazes e biológicos seguros (novas gerações de vacinas) para o controle dos parasitas internos mais relevantes em animais de produção e de companhia.

Palavras-chave: Manejo integrado de parasitas internos, saúde pública, zoonose

Abreviaturas

OMICS: genômica, proteômica, metabolômica, metagenômica y transcriptômica; SARS-CoV-2: Síndrome Respiratorio Agudo Severo por Coronavirus 2; ADN: Ácido desoxirribonucleico; ARN: Ácido ribonucleico; WGH: Homogeneizado de intestino *Haemonchus placei*; FEC: número de huevos por gramo de heces; AsHb: Hemoglobina de *Ascaris suum*; QuilA®: Saponina adyuvante; TSOL16: Antígenos de oncercos de *Taenia solium*; pcDNA: Vacuna de fusión de ADN; Gam56: plásmido recombinante de *Eimeria maxima*; TA4: Antígeno de *Eimeria tenella*; IL-2: Interleucina 2; pVAX-LDH, pVAX-LDH-IFN- γ y pVAX-LDH-IL-2: Plásmidos de

antígenos recombinantes de *Eimeria acervulina*; APGA: Antígenos de gametocitos purificados por afinidad; ETRHO1: Gen romboidal de *Eimeria tenella*; CMA: Arteria mesentérica craneal; AS03®: Emulsión de aceite en agua; EgTrp y EgA31: Proteínas recombinantes de *Ancylostoma caninum* adulto; EgM4, EgM9 y EgM123: Proteínas de fusión solubles purificadas recombinantes de *Echinococcus granulosus*; rTcVcan y rTcCad: proteínas recombinantes de *Toxocara canis*; APC: Células presentadoras de antígeno; HMC: Complejo mayor de histocompatibilidad; HMC II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II; IgE: Inmunoglobulina clase E; IgG1: Inmunoglobulina subclase G1; IgG4: Inmunoglobulina subclase G4.

INTRODUCCIÓN

La iniciativa de desarrollar y administrar vacunas que proporcionen una inmunidad adecuada al hospedero y así abordar el control de helmintos ha sido uno de los principales objetivos de la investigación en inmunología durante las últimas décadas (Hein & Harrison, 2005). Es importante supervisar las enfermedades parasitarias y la resistencia que han adquirido estos organismos, debido a su tratamiento farmacológico habitual, utilizado para reducir los riesgos de aparición de enfermedades zoonóticas como: cisticercosis, equinococosis, anquilostomiasis (Bethony et al., 2011), además de toxocariasis (Jaramillo et al., 2020). Por ello, la vacunación se ha convertido en una de las formas más eficaces y sostenibles de controlar las enfermedades parasitarias y en una herramienta clave para salvaguardar la salud animal y humana (Bagnoli et al., 2011).

Los parásitos gastrointestinales como *Haemonchus contortus*, *Echinococcus granulosus*, *Taenia solium* y *Eimeria* spp., afectan a más de la mitad de la población mundial, causando importantes enfermedades y discapacidades (Jourdan et al., 2018), evidenciando que estas enfermedades parasitarias desatendidas afectan la economía potencial a través de su efecto debilitante en la salud humana y animal (Hotez et al., 2009). Debido a esto, se ha generado la

necesidad de desarrollar vacunas para prevenir o erradicar estas infecciones. Si bien para todas las infecciones parasitarias existen diferentes alternativas de tratamiento definidas, constantemente se presentan problemas que hacen aplicaciones fallidas de estos tratamientos, provocando efectos secundarios como baja protección, resistencia a los antiparasitarios por uso repetido y reinfección. Por las razones mencionadas anteriormente, los desarrollos en el campo de la inmunología han estado enfocados en originar vacunas antiparasitarias que cumplen todos los requisitos y provoquen una respuesta inmune bien definida (Versteeg et al., 2019). Sin embargo, a pesar de las múltiples investigaciones realizadas en las últimas décadas, son pocas las vacunas parasitarias disponibles hasta la fecha en el campo de la Medicina Veterinaria (Morrison & Tomley, 2016), situación revisada sistemáticamente y actualmente por nuestro grupo de investigación (Vargas et al., 2022).

Las generaciones de vacunas establecen criterios de desarrollo técnico-científico en torno a la metodología utilizada para la obtención de la formulación vacunal, la cual puede ser utilizando el agente infeccioso, una parte o un subproducto de este, normalmente luego de ser inactivado o muerto (Loukas & Good , 2013), siendo este el caso de las vacunas de primera generación. Sin embargo, en los últimos años, ha habido una mayor innovación en la tecnología aplicada a los procesos biológicos y la capacidad de secuenciar el genoma de patógenos, incluidos los parásitos gastrointestinales. Se han utilizado métodos y patrones bioinformáticos para predecir la localización de antígenos, siendo estas tecnologías prometedoras para el descubrimiento de vacunas recombinantes, que se han aplicado con éxito para inmunizar contra enfermedades en Medicina Veterinaria; este método se conoce como vacunología inversa (Jorge & Dellagostin, 2017), siendo este el caso de las vacunas de segunda generación.

Algunos software gratuitos en línea permiten realizar análisis bioinformáticos prácticos y aplicables a esta metodología, ejemplo: BLASTX

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), PSORT (<http://www.psort.org/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), SOSUI (<http://bp.nuap.nagoyau.ac.-jp/sosui/>), ScanPROSITE (<http://au.expasy.org/prosite/>), entre otros; todos son particularmente aplicables a ciertos momentos de la metodología de vacunología inversa, desde la identificación de epítomos y sus secuencias de nucleótidos hasta la identificación de péptidos señal relacionados con el respectivo péptido promotor vacunal. Este enfoque reduce el tiempo requerido para el reconocimiento de vacunas promisorias y brinda opciones viables para aquellas vacunas que han sido difíciles de desarrollar (Seib et al., 2012; Unnikrishnan et al., 2012).

Con base en los desarrollos de la OMICS, la generación de vacunas que contengan plásmidos de ADN o ARN, caso de las vacunas de tercera generación, las cuales codifican un gen proteico del agente infeccioso, el cual tiene capacidad inmunogénica para el control del agente infeccioso respectivo (Dhama et al., 2008). Estas vacunas son económicas y tecnológicamente sustentables para ser fabricadas, así como su respuesta inmune no interfiere con los anticuerpos maternos (Krieg, 2002). Su manejo es estable a temperatura ambiente, en la mayoría de ellas. Aun así, tienen una gran desventaja biológica frente a las vacunas de primera generación, y es su inmunogenicidad, la cual es mucho menor y necesitan ser formuladas con potentes adyuvantes específicos de la respuesta inmune (Wedrychowicz, 2015). Una respuesta inmunitaria eficaz contra un antígeno requiere la adición de un adyuvante en el desarrollo de vacunas (Harrison et al., 1999). Estas sustancias se han utilizado para mejorar la eficacia de las vacunas desde la década de 1920 (Cox & Coulter, 1997), debido a su papel en la optimización de la respuesta inmunitaria específica a los antígenos de las vacunas, sobre todo para las vacunas parasitarias, mediante la mejora selectiva de diferentes mecanismos de respuesta del sistema inmunológico direccionando la activación del sistema inmunitario del hospedero (Bomford, 1989).

Por otro lado, todos están en la expectativa del gran ensayo clínico de uso de vacunas de tercera generación en el control de la pandemia por SARS-CoV-2, dado que existen hipótesis de efectos indeseables como la integración en el genoma de la especie inoculada, activación de proto-oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores y la posibilidad de generar anticuerpos antinucleares (Dunham, 2002). Estas hipótesis serán aceptadas o descartadas en unos años, dada la vacunación a base de biológicos de ADN o ARN que actualmente se utilizan en el mundo para el control de la enfermedad COVID-19 (Krammer, 2020).

El tratamiento con fármacos antihelmínticos no ha sido eficaz en el control de parásitos gastrointestinales en los sistemas de producción animal (ej. ganaderías), principalmente por la rápida reinfección que se produce tras el tratamiento y la baja eficacia por el uso repetido de estos fármacos (Başka et al., 2013). Esta situación genera la necesidad de producir vacunas eficientes y seguras contra estos parásitos (McVey & Shi, 2010), llevando el uso de vacunas en Medicina Veterinaria a convertirse en una práctica común, garantizando el control y/o eliminación de diversas enfermedades parasitarias (Knox & Smith, 2001). El objetivo de esta revisión es aportar información sobre las vacunas comercializadas en la actualidad para el control de determinados parásitos gastrointestinales, de interés para la salud pública, en animales de producción y animales de compañía. Así como presentar de manera general una serie de estudios clínicos experimentales de biológicos promisorios para el control de parásitos gastrointestinales en animales, que podrían formar parte del arsenal terapéutico en la práctica de la Medicina Veterinaria en el futuro.

Algunos antígenos prometedores para la inmunoprofilaxis de parásitos gastrointestinales en animales

Los ensayos clínicos experimentales realizados en los últimos años han servido para generar un gran avance en la búsqueda de antígenos que sirvan para

minimizar el impacto que estos parásitos generan en los animales de producción y de compañía. En los rumiantes, el primero se denominó contortina, un polímero extracelular intestinal obtenido del estado adulto del *Haemonchus contortus* (enfermedad: haemonchosis). El uso de este antígeno produjo una disminución de las cargas parasitarias de este nematodo hasta un 78% en las ovejas inmunizadas (Munn et al., 1987; Newton & Munn, 1999). En otro estudio clínico, se inmunizaron terneros con WGH de *Haemonchus placei*; no se observó una reducción significativa en el número total de nematodos obtenidos del abomaso, pero sí se redujo significativamente el número de hembras adultas y FEC, lo que indica una alta protección contra las hembras de estos nematodos y un posible efecto inmunoproliférico sobre el ciclo de vida de este parásito (Siefker y Rickard, 2000).

Otro parásito que afecta al ganado bovino es el nematodo *Oesophagostomum* spp. este es un parásito importante que también infecta a humanos y tiene un amplio potencial zoonótico debido a su gran distribución (Li et al., 2017); pertenece a la superfamilia Strongyloidea y es un nematodo de gran importancia económica a nivel mundial (Tyagi et al., 2015). Se han inmunizado terneros con diferentes dosis de extracto soluble de larvas de *Oesophagostomum radiatum* cultivadas in vitro, con esta metodología se observó una reducción del 81% y 99% en la carga de nematodos adultos en intestino, y disminuciones en FEC en un 75% y 100%, a dosis bajas o altas de este extracto, respectivamente (East et al., 1988). Si bien existen grandes avances científicos, a lo largo de los años, sustentados en estudios clínicos de vacunas experimentales para el control de las principales parasitosis gastrointestinales en grandes y pequeños rumiantes; existen pocos resultados concretos en la actualidad de la aplicabilidad de procesos inmunoproliféricos o inmunoterapéuticos soportados en vacunas desarrolladas en este campo dentro de la medicina veterinaria, específicamente para el control de la haemonchosis (Bassetto et al., 2014; OMS, 2020). Estos tiempos y terrenos han ganado estos parásitos, llegando a impactar gravemente indicadores de producción y profundizando la crisis de salud pública tanto en países

industrializados como en vías de desarrollo, donde los grandes y pequeños rumiantes son fuente de diversos alimentos básicos para el consumo mundial.

Se han llevado a cabo varios estudios clínicos de experimentación de vacunas en cerdos para estudiar la inmunoprofilaxis como estrategia de control de *Ascaris suum*. En uno de los estudios se probó AsHb purificada junto con el adyuvante Quil-A®, donde se generó una protección considerable en los cerdos que fueron inmunizados con esta vacuna, siendo esta un posible candidato vacunal (Vlaminck et al., 2011). Por otro lado, se estudió el desarrollo de inmunidad a *Ascaris suum* en cerdos inmunizados con fragmentos de cutícula aislados de larvas de diferentes estadios (L2/L3) de *Ascaris suum*, lo que resultó en una reducción del 44% al 49% en el número de larvas aisladas de los tejidos de cerdos inmunizados (Hill et al., 1994). Asimismo, otro estudio donde se inmunizó cerdos con el antígeno recombinante TSOL16, demostró que este antígeno puede proporcionar niveles adecuados de protección frente al desafío con huevos de *Taenia solium* (Gauci et al., 2012).

En este camino de innovación científica con tendencia a la evolución de las técnicas de generación de vacunas, en la industria de pollos de engorde, se creó una vacuna experimental de ADN que agrupa la proteína *Eimeria maxima* Gam56 (pcDNA-Gam56), la cual indujo un aumento significativo en la propagación de linfocitos y se observó una disminución en la eliminación de ooquistes del 53,7% en pollos de engorde inoculados (Xu et al., 2013). En la misma línea de desarrollo de vacunas, se desarrolló otro biológico experimental para el control de *Eimeria* spp. a partir de ADN recombinante pcDNA-TA4-IL-2 que expresa el antígeno TA4 de *Eimeria tenella* e IL-2 de pollo de engorde, donde se observó una reducción promedio de ooquistes de 72.6% (Song et al., 2009). Otro ejemplo de desarrollo de vacunas para el control de *Eimeira* spp., es la elaboración de tres plásmidos vacunales: pVAX-LDH, pVAX-LDH-IFN- γ y pVAX-LDH-IL-2, donde la interacción anticoccidial de los grupos pVAX-LDH- LDH-IFN- γ y pVAX-LDH-IL-2 fueron más altos que el grupo control, mostrando una reducción significativa de *Eimeria*

acervulina de 56.82% y 57.59%, respectivamente, en aves inmunizadas (Song et al., 2010).

Además de estos estudios que vinculan la última tecnología en generación de vacunas, previamente se habían realizado otros importantes estudios clínicos en el control de la coccidiosis aviar, un ejemplo de estos es la administración de antígenos de gametocitos purificados por afinidad (APGA) de *Eimeria maxima*, emulsionado en adyuvante de Freund, donde hubo una reducción en la producción total de ooquistes de este protozoo en un 45-63% (Wallach et al., 1995). En otro estudio clínico, se inoculó a pollos de engorde con una proteína recombinante de ETRHO1 de *Eimeria tenella*, donde se demostró que ETRHO1 podía proporcionar una protección del 77,3 % en los pollos de engorde inoculados (Li et al., 2012).

En equinos los helmintos son los parásitos más importantes en los países industrializados (Klei, 2000). Entre estos se encuentra *Strongylus vulgaris*, el cual provoca afectaciones en su hospedero, migrando por todo el organismo durante su ciclo biológico, donde estos parásitos se fijan en la CMA durante la migración larval (Swiderski et al., 1999). Si bien esta zona anatómica no es la ubicación definitiva de las larvas de *Strongylus vulgaris*, es probablemente el lugar donde causa las mayores lesiones y genera la mayor acumulación de larvas, caracterizada por grandes émbolos dentro de la luz vascular, generando inflamación de la capa media y significativa aumento de la CMA. Esta patología se conoce como arteritis verminosa (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Hay pocos estudios sobre el desarrollo de vacunas antiparasitarias gastrointestinales en equinos. En uno de ellos, se realizó un estudio en ponis inoculados con larvas de *Strongylus vulgaris* (L3) atenuadas por radiación asociada a un adyuvante: Sigma Adjuvant System®; donde esta formulación vacunal demostró una reducción del 91,8% de larvas migratorias de *S. vulgaris* en ponis inoculados (Monahan et al., 1994). Por otra parte, un estudio posterior en ponis inoculados por vía oral con larvas de *Strongylus vulgaris* (L3) irradiadas a dosis de 70 Kr, 100 Kr, 130 Kr;

generó una disminución del 50 al 82% en el número de nematodos adultos extraídos de los intestinos de ponis previamente inmunizados (Klei et al., 1989).

Se han realizado estudios en animales de compañía utilizando como antígeno inmunoprotector en caninos el Ac-16, un antígeno inmunodominante de *Ancylostoma caninum* combinado con el adyuvante AS03®, que promovió respuestas inmunes humorales y celulares desarrollando una protección parcial significativa contra la infección por *Ancylostoma caninum* (Fujiwara et al., 2007). Por otro lado, en ensayos con un candidato vacunal oral con dos proteínas recombinantes de la fase adulta de este parásito: EgTrp, que es una tropomiosina y EgA31, que es una proteína análoga a la paramiosina. Los caninos inoculados con EgTrp y EgA31 exhibieron una disminución en la carga parasitaria de un 70% a un 80%, mostrando una alta eficiencia para reducir la transmisión humano-animal (Petavy et al., 2008). Asimismo, en otro estudio con antígenos recombinantes EgM4, EgM9 y EgM123 utilizados para la protección de caninos frente a la exposición a este cestodo, se promovió un nivel de protección notablemente alto, en torno al 97-100% (Zhang et al., 2006).

Nuestro grupo de investigación está trabajando actualmente en el desarrollo de una vacuna para controlar *Toxocara canis*, el principal nematodo canino con importantes impactos en la salud pública. Los ensayos clínicos se realizaron en cachorros infectados experimentalmente en condiciones controladas de laboratorio e infectados naturalmente (transmisión transplacentaria), a partir del uso de dos proteínas recombinantes rTcVcan y rTcCad producidas bajo la metodología de vacunología inversa con resultados prometedores en el control de la toxocariasis en el modelo murino (Salazar Garces et al., 2020), añadido a un adyuvante de inducción de respuesta Th1/Th2 mixto, Quil-A®. En este primer ensayo clínico, los caninos inoculados con rTcVcan + QuilA® redujeron FEC en un 95%, además se evidenció la reducción de los huevos obtenidos del útero de hembras adultas expulsadas farmacológicamente (58,38%) (Jaramillo-Hernández et al., 2022).

Principios de vacunación y desarrollo de vacunas: vacunas contra parásitos gastrointestinales utilizadas en Medicina Veterinaria

El sistema inmunitario se puede dividir en dos sistemas: el innato y el adaptativo, que se relacionan entre sí para crear una fuerte respuesta inmunitaria (Clem, 201). Las vacunas intervienen en la generación de respuestas inmunitarias innatas y aceleran la aparición de APC, estimulando así una respuesta inmunitaria adaptativa protectora frente a un patógeno (Di Pasquale et al., 2015). Si se trata de un antígeno bacteriano o parasitario, se acoplará a la proteína mediante el HMC II principal y las APC lo presentarán a una célula CD4+ que posiblemente desencadenará inmunidad provocada por anticuerpos (Meeusen et al., 2007). A diferencia del sistema inmunitario innato, el modo de acción del sistema inmunitario adaptativo es específico del patógeno. Esta respuesta innata tendrá más tiempo para ocurrir (Clem, 2011). Sin embargo, el sistema inmunitario adaptativo tiene memoria, las células T se multiplican a lo largo de la infección, formando células de memoria de larga duración que se ajustan a la expansión secundaria después de una exposición constante al mismo patógeno (Sun et al., 2009).

Los helmintos tienen moléculas de interacción con diversos receptores de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos de células del sistema inmune, la mayoría de estas interacciones se ejecutan con el fin de evadir la respuesta del mismo sistema, tanto innato como adaptativo, por ejemplo, induciendo una respuesta inmunitaria modificada por Th2 con la producción de células reguladoras y citocinas (Marciani, 2017). Hasta la fecha, se ha avanzado mucho en la determinación de las células y las citocinas involucradas en la generación de la inmunidad tipo 2, que generalmente brinda protección contra la infección por helmintos (Maizels et al., 2012). Las citoquinas son intermediarias de la respuesta inmune innata, por lo que funcionan como inductores y efectores en todas las etapas durante la infección por helmintos, dentro de la reacción Th2 se incluyen interleucinas (IL): IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-21 (Meeusen et al., 2005). Las

células CD4+ estimulan una serie de componentes antiparasitarios tipo 2, incluidos anticuerpos compensadores, células de defensa y leucocitos, así como inmunoglobulina (Ig) G1 (IgG1), IgG4 e IgE; además, poblaciones expandidas de eosinófilos, basófilos, mastocitos, células linfoides tipo 2 innatas y macrófagos altamente activados. Determinados efectos de estas vías anulan y deshabilitan las acciones del sistema inmune sobre los parásitos, los cuales en teoría finalmente conducirían a su expulsión (Maizels et al., 2012; Babu & Nutman, 2019).

Los antígenos de las vacunas deben estimular componentes protectores como los generados en la inmunidad natural. La tipificación de estos mecanismos se convierte en un requisito previo para el diseño inteligente de la formulación y administración de una vacuna (Emery et al., 1993). Los estudios han descrito que estos nematodos provocan respuestas inmunes dominantes Th2 y proliferación en la mucosa intestinal de mastocitos y eosinófilos (Foster et al., 2012), en contraste con las respuestas Th1, que promueven respuestas mediadas por células que involucran macrófagos y se consideran más importantes en la protección contra agentes protozoarios (Dalton & Mulcahy, 2001). Ejemplo de estas condiciones hacen referencia al desarrollo de vacunas en sistemas de producción aviar, las vacunas anti-*Eimeria* existentes consisten en organismos completamente virulentos o vivos atenuados (Dalton & Mulcahy, 2001). Estas vacunas provocan una fuerte respuesta celular y de anticuerpos que generalmente producirá inmunidad durante un período considerable con solo una o dos inmunizaciones. En algunos casos, es posible atenuar los microorganismos de tal manera que pierden su potencial para causar daño al individuo inoculado, pero conservan la capacidad de reproducirse espontáneamente dentro del huésped (Goldsby et al., 2007).

Las vacunas de primera generación incluyen: A. Vacunas con patógeno vivo, que tienen el atributo de expresar una amplia gama de antígenos patógenos. Esto es importante ya que los antígenos pueden expresarse de manera diferente en las diferentes etapas de su vida (Chambers et al., 2016). Es el caso de las vacunas

contra la coccidiosis aviar (*Eimeria* spp.): CocciVac® e Immucox®, compuestas por organismos vivos; y Paracox® y Livacox® compuestos de organismos vivos atenuados (Dalton & Mulcahy, 2001). B. Vacuna con organismos inactivados o muertos, este es otro método de inmunización, en el que se desactiva el microorganismo patógeno, una subunidad del mismo o sus toxinas tras la exposición a altas temperaturas o productos químicos, entre otras formas de inactivación (Goldsby et al., 2007); son menos variables y no representan un riesgo de retorno a la patogenicidad, pero su incapacidad para infectar células y activar las células T citotóxicas las hace menos efectivas para proteger a los huéspedes (Meeusen et al., 2007). Por ello, requieren varias inmunizaciones y la introducción de adyuvantes para preservar una adecuada defensa (Chambers et al., 2016). Este es el caso de la vacuna comercial GiardiaVax™ que fue indicada para su uso en caninos para combatir el protozooario *Giardia lamblia* (Figura 1), donde la vacuna actúa principalmente generando una respuesta humoral y celular específica contra el parásito (Meeusen et al., 2007) (vacuna fuera del mercado desde unos años atrás), y la vacuna Barbervax® para el control del nematodo *Haemonchus contortus* en ovinos y CoxAbic® para el control de la coccidiosis aviar.



Figura 1. Gardiavax®, vacuna comercializada utilizada para el control de *Giardia lamblia* en perros, Gardiavax® es una vacuna de primera generación que contiene un concentrado de *Giardia lamblia* ($\geq 1,2 \times 10^8$ organismos/mL) inactivo.

Las vacunas de segunda generación están representadas por vacunas recombinantes (figura 2), que contienen partículas seleccionadas de un determinado microorganismo que pueden ser proteínas, polisacáridos o partículas similares a virus (Vetter et al., 2018). Incluyen solo determinantes antigénicos frente a los cuales los anticuerpos o las células T se registran, ensamblan y estimulan el sistema inmunitario más fácilmente (Clem, 2011); son vacunas seguras y generan menos reacciones adversas. Sin embargo, los antígenos ocultos suelen provocar una inmunidad protectora incompleta; estas vacunas generalmente requieren inoculaciones repetidas con la adición de adyuvantes que generan fuertes respuestas, haciéndolas menos efectivas y competitivas (Meeusen et al., 2007). Entre las vacunas de proteínas recombinantes, se encuentra la vacuna Providean® Hydatil EG95 y la vacuna Cysvax™, para el control de *Echinococcus granulosus* en sus hospederos intermedios (mamíferos ungulados) y *Taenia solium* en cerdos, respectivamente.

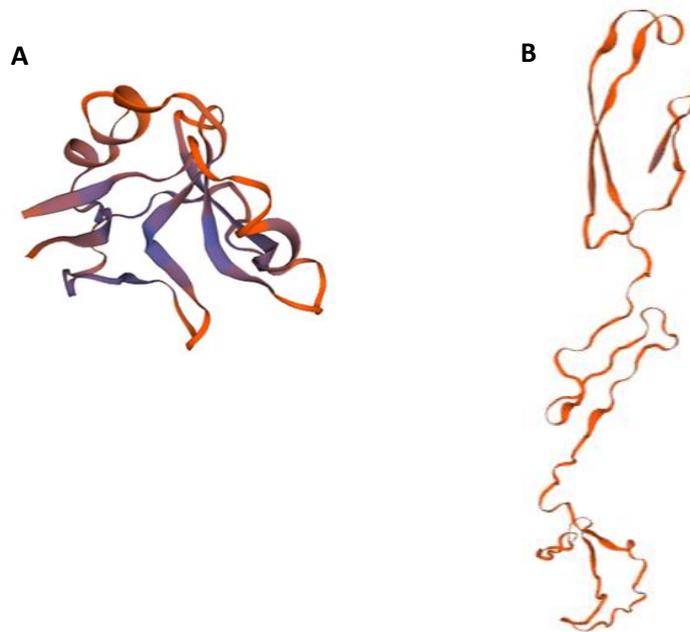


Figura 2. Proteínas recombinantes utilizadas en la primera investigación clínica de una vacuna para el control de *Toxocara canis* en caninos; ejemplo de una posible vacuna de segunda generación para el control de las principales geohelmintiasis zoonótica del mundo. A. Proteína recombinante homóloga al canal de potasio de *T. canis* (rTcVcan); B.

Proteína recombinante homóloga a la cadherina de *T. canis* (rTcCad). Imágenes de las proteínas recombinantes creadas en el software <https://swissmodel.expasy.org/>. Este ensayo clínico es uno de los experimentos designados bajo la patente de invención BR 10 2019 0215119 "Método para la producción de proteínas recombinantes de *Toxocara canis* utilizadas como vacuna para el control de la toxocariasis canina". El cual pertenece a la Universidad Federal de Bahía, registrado en el Ministerio de Industria de Brasil, cuyos autores son: Alcantara-Neves NM., Salazar-Gárces LF., Pinheiro C., Pacheco L., Santiago L., Santos SP., Jaramillo -Hernández DA. 2019.

Las vacunas de tercera generación son las vacunas de ADN o ARN, que se basan en la capacidad de expresión de un vector inyectado, ya sea en células musculares o cutáneas, para exponer antígenos vacunales en el tejido del huésped inmunizado, lo que estimula la presentación de antígenos. llevando a una fuerte respuesta inmunológica (Chambers et al., 2016; Vetter et al., 2018). Una vez que se administra la vacuna de ADN, el antígeno codificado se manifiesta en las células del hospedero y es presentado por las células dendríticas (tipo de APC). Esto es más probable que ocurra en los ganglios linfáticos que tienen la función de drenaje, provocando respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares (Coban et al., 2008). Estas vacunas actuales ofrecen mayores ventajas sobre las vacunas tradicionales, en términos de facilidad de producción, persistencia y valorización (Dunham, 2002). Si bien las vacunas vivas se destacan para el control de la coccidiosis, las vacunas de ADN han sido una buena opción, ya que se inducirá una respuesta inmune completa y constante sin riesgo de generar la enfermedad. Un claro ejemplo es Gam56, que es un antígeno derivado del estadio de gametocito de *Eimeria maxima*, que tiene una muy buena capacidad para activar el sistema inmunitario, induciendo una respuesta inmunitaria (Xu et al., 2013); hasta el momento, el campo de la medicina veterinaria a nivel mundial carece de vacunas comerciales para el control de los parásitos gastrointestinales estudiados en este manuscrito clasificados dentro de las vacunas de tercera generación.

CONCLUSIONES

La vacunación es sin duda el método más seguro y factible para la prevención, control y erradicación de enfermedades infecciosas (Calamante, 2018). Generar vacunas contra los parásitos gastrointestinales es un desafío asumido por la ciencia con un propósito claro: generar una protección adecuada para la población que está constantemente expuesta a los parásitos y minimizar los riesgos que se pueden presentar durante una posible infección parasitaria (Rodríguez & Olivares, 2019). Los recientes avances en genómica permiten desarrollar, mediante técnicas bioinformáticas, pronósticos sobre la eficacia de determinados antígenos y su capacidad de respuesta inmunogénica, lo que se espera reduzca los tiempos y estudios para seleccionar los mejores antígenos para el desarrollo de vacunas biológicas contra parásitos gastrointestinales (Cruz et al., 2017).

Además de estos desarrollos de OMICS, la implementación de nuevos adyuvantes que dirijan una respuesta inmune favorable para el antígeno seleccionado permitiría generar procesos de producción biológica de antiparasitarios altamente eficientes (Rodríguez & Olivares, 2019). Sin embargo, deja en claro que existe la necesidad de continuar investigando métodos terapéuticos que sean seguros para los animales y el medio ambiente, debido al avance que se ha generado en temas de resistencia parasitaria (Murray, 1989). Los estudios descritos en esta revisión indican que las perspectivas a corto plazo para obtener agentes vacunales prometedores, tanto en términos de eficacia como de composición, contra los parásitos gastrointestinales presentes en los animales de producción y de compañía son muy alentadoras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Babu S, Nutman T. Immune Responses to Helminth Infection. *Clinical Immunology*, 2019:437-447.
2. Bagnoli F, Baudner B, Mishra P, Bartolini E, Fiaschi L, Mariotti P, Nardi-Dei V, Boucher P, Rappuoli R. Designing the next generation of vaccines for global public health. *Omic: a journal of integrative biology*, 2011; 15(9):545–566.

3. Baška P, Wiśniewski M, Krzyżowska M, Długosz E, Zygnier W, Górski P, Wędrychowicz H. Molecular cloning and characterisation of in vitro immune response against astacin-like metalloprotease Ace-MTP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. *Experimental parasitology*, 2013;133(4):472–482.
4. Bassetto C, Picharillo É, Newlands F, Smith D, Fernandes S, Siqueira R, Amarante F. Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. *International journal for parasitology*, 2014;44(14):1049–1054.
5. Bethony M, Cole N, Guo X, Kamhawi S, Lightowlers W, Loukas A, Petri W., Reed S, Valenzuela G, Hotez J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunological reviews*, 2011;239(1):237–270.
6. Bomford R. Adjuvants for anti-parasite vaccines. *Parasitology today (Personal ed.)*, 1989;5(2):41–46.
7. Calamante, G. Desarrollo de vacunas de nueva generación Desarrollo de vacunas de nueva generación, 2018. Disponible en: <http://ria.inta.gob.ar/contenido/desarrollo-de-vacunas-de-nueva-generacion-para-uso-veterinario?l=es>
8. Chambers A, Graham P, La Ragione M. Challenges in Veterinary Vaccine Development and Immunization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2016;1404:3–35.
9. Clem S. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of global infectious diseases*, 2011;3(1):73–78.
10. Coban C, Koyama S, Takeshita F, Akira S, Ishii J. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Human vaccines*, 2008;4(6):453–456.
11. Cox C, Coulter R. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 1997;15(3):248–256.
12. Cruz V, Rosado E, Dumonteil E. Desarrollo de vacunas contra parásitos. *Revista Ciencia*, 2017;68(1):81-85.
13. Dalton P, Mulcahy G. Parasite vaccines--a reality?. *Veterinary parasitology*, 2001;98(1-3):149–167.
14. Dhama K, Mahendran M, Gupta K, Rai A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. *Veterinary research communications*, 2008;32(5),341-356.
15. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 2015;3(2):320–343.
16. Dunham P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Research in veterinary science*, 2002;73(1):9–16.
17. East J, Berrie A, Fitzgerald J. *Oesophagostomum radiatum*: successful vaccination of calves with an extract of in vitro cultured larvae. *International journal for parasitology*, 1988, 18(1):125–127.
18. Emery L, McClure J, Wagland M. Production of vaccines against gastrointestinal nematodes of livestock. *Immunology and cell biology*, 1993;71(5):463–472.
19. Foster N, Berndt A, Lalmanach C, Methner U, Pasquali P, Rychlik I, Velge, P, Zhou X, Barrow P. Emergency and therapeutic vaccination--is stimulating

- innate immunity an option?. *Research in veterinary science*, 2012;93(1),7–12.
20. Fujiwara T, Zhan B, Mendez S, Loukas A, Bueno L, Wang Y, Plieskatt J, Oksov Y, Lustigman S, Bottazzi E, Hotez P, Bethony M. Reduction of worm fecundity and canine host blood loss mediates protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16. *Clinical and vaccine immunology*, 2007;14(3):281–287.
 21. Gauci G, Jayashi M, Gonzalez E, Lackenby J, Lightowers W. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis by immunization with novel recombinant antigens. *Vaccine*, 2012;30(26):3824–3828.
 22. Goldsby A, Kindt J, Osborne A, Kuby J. vaccines. In: Mc Graw Hill, editors. *Kuby Immunology*, 6th edition, New York: E. Publishing Inc; 2007:475-490.
 23. Harrison B, Shakes R, Robinson M, Lawrence B, Heath D, Dempster P, Lightowers W, Rickard D. Duration of immunity, efficacy and safety in sheep of a recombinant *Taenia ovis* vaccine formulated with saponin or selected adjuvants. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1999;70(3-4):161–172.
 24. Hein R, Harrison B. Vaccines against veterinary helminths. *Veterinary parasitology*, 2005;132(3-4):217–222.
 25. Hill E, Fetterer H, Romanowski D, Urban Jr. The effect of immunization of pigs with *Ascaris suum* cuticle components on the development of resistance to parenteral migration during a challenge infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1994;42(2):161–169.
 26. Hotez J, Fenwick A, Savioli L, Molyneux H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet (London, England)*, 2009;373(9674):1570–1575.
 27. Jaramillo D, Salazar F, Baquero M, Pinheiro S, Alcantara M. Toxocariasis and *Toxocara* vaccine: a review. *Revista Orinoquia*, 2020;24:79-95.
 28. Jaramillo A, Salazar F, Pacheco C, Pinheiro S, Alcantara M. Protective response mediated by immunization with recombinant proteins in a murine model of toxocariasis and canine infection by *Toxocara canis*. *Vaccine*, 2022;40(6):912-923.
 29. Jorge S, Dellagostin A. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 2017;1(1),6–13.
 30. Jourdan M, Lamberton L, Fenwick A, Addiss G. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 2018;391(10117):252-265.
 31. Klei R. Equine immunity to parasites. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 2000;16(1):69–vi.
 32. Klei R, French D, Chapman R, McClure R, Dennis A, Taylor W, Hutchinson W. Protection of yearling ponies against *Strongylus vulgaris* by foalhood vaccination. *Equine veterinary journal. Supplement*, 1989;(7):2–7.
 33. Knox P, Smith D. Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Veterinary parasitology*, 2001;100(1-2), 21–32.

34. Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, 2020;586(7830):516-527.
35. Krieg M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology*, 2002;20(1):709-760.
36. Li J, Zheng J, Gong P, Zhang X. Efficacy of *Eimeria tenella* rhomboid-like protein as a subunit vaccine in protective immunity against homologous challenge. *Parasitology research*, 2012;110(3):1139–1145.
37. Li K, Lan Y, Luo H, Shahzad M, Zhang H, Wang L, Zhang L, Liu D, Liu X, Hao Y, Sizhu S, Li J. Prevalence of three *Oesophagostomum* spp. from Tibetan Pigs analyzed by Genetic Markers of nad1, cox3 and ITS1. *Acta parasitologica*, 2017;62(1):90–96.
38. Loukas A, Good F. Back to the future for antiparasite vaccines?. *Expert review of vaccines*, 2013;12(1):1-4.
39. Maizels M, Hewitson P, Smith A. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current opinion in immunology*, 2012;24(4):459–466.
40. Marciani J. Effects of immunomodulators on the response induced by vaccines against autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 2017;50(7),393–402.
41. McVey S, Shi J. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 2010;40(3),381–392.
42. Meeusen N, Balic A, Bowles V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2005;108(1-2):121–125.
43. Meeusen N, Walker J, Peters A, Pastoret P, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. *Clinical microbiology reviews*, 2007;20(3),489–510.
44. Monahan M, Taylor W, Chapman R, Klei R. Experimental immunization of ponies with *Strongylus vulgaris* radiation-attenuated larvae or crude soluble somatic extracts from larval or adult stages. *The Journal of parasitology*, 1994;80(6):911–923.
45. Morrison I, Tomley F. Development of vaccines for parasitic diseases of animals: Challenges and opportunities. *Parasite immunology*, 2016;38(12):707–708.
46. Munn A, Greenwood A, Coadwell J. Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 1987;94(2):385–397.
47. Murray K. Molecular vaccines against animal parasites. *Vaccine*, 1989;7(4):291–299.
48. Newton E, Munn A. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology today (Personal ed.)*, 1999;15(3):116–122.
49. Petavy F, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T, Azzouz S, Schreiber F, Alvite G, Sarciron E, Maskell D, Esteves A, Bosquet G. An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*,

- the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. *PLoS neglected tropical diseases*, 2008;2(1):125.
50. Reinemeyer R, Nielsen K. Parasitism and colic. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 2009;25(2):233–245.
 51. Rodríguez G, Olivares L. Vacunas parasitarias: un recuento bibliográfico. *Revista de Salud Animal*, 2019;41(3):08.
 52. Salazar F, Santiago F, Santos S, Jaramillo A, da Silva B, Alves V, Silveira F, Barrouin M, Cooper J, Pacheco L, Pinheiro C, Alcantara M. Immunogenicity and protection induced by recombinant *Toxocara canis* proteins in a murine model of toxocariasis. *Vaccine*, 2020;38(30):4762–4772.
 53. Seib L, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2012;18(5):109–116.
 54. Siefker C, Rickard G. Vaccination of calves with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. *Veterinary parasitology*, 2000;88(3-4):249–260.
 55. Song H, Yan R, Xu L, Song X, Shah A, Zhu H, Li X. Efficacy of DNA vaccines carrying *Eimeria acervulina* lactate dehydrogenase antigen gene against coccidiosis. *Experimental parasitology*, 2010;126(2):224–231.
 56. Song X, Xu L, Yan R, Huang X, Shah A, Li X. The optimal immunization procedure of DNA vaccine pcDNA-TA4-IL-2 of *Eimeria tenella* and its cross-immunity to *Eimeria necatrix* and *Eimeria acervulina*. *Veterinary parasitology*, 2009;159(1):30–36.
 57. Sun C, Beilke N, Lanier L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 2009;457(7229):557–561.
 58. Swiderski E, Klei R, Folsom W, Pourciau S, Chapman A, Chapman R, Moore M, McClure R, Taylor W, Horohov W. Vaccination against *Strongylus vulgaris* in ponies: comparison of the humoral and cytokine responses of vaccinates and nonvaccinates. *Advances in veterinary medicine*, 1999;41:389–404.
 59. Tyagi R, Joachim A, Ruttkowski B, Rosa A, Martin C, Hallsworth K, Zhang X, Ozersky P, Wilson K, Ranganathan S, Sternberg W, Gasser B, Mitreva M. Cracking the nodule worm code advances knowledge of parasite biology and biotechnology to tackle major diseases of livestock. *Biotechnology advances*, 2015;33(6Pt1):980–991.
 60. Unnikrishnan M, Rappuoli R, Serruto D. Recombinant bacterial vaccines. *Current opinion in immunology*, 2012;24(3):337–342.
 61. Vargas M, Prieto D, Baquero M, Corredor W, Alcantara M, Jaramillo D. Vaccines for gastrointestinal parasites, a pillar of preventive medicine in veterinary practice: Systematic review. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 2022;13(1):221-251.
 62. Versteeg L, Almutairi M, Hotez J, Pollet J. Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections. *Vaccines*, 2019;7(4):122.

63. Vetter V, Denizer G, Friedland R, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of medicine*, 2018;50(2):110–120.
64. Vlamincx J, Martinez M, Dewilde S, Moens L, Tilleman K, Deforce D, Urban J, Claerebout E, Vercruyse J, Geldhof P. Immunizing pigs with *Ascaris suum* haemoglobin increases the inflammatory response in the liver but fails to induce a protective immunity. *Parasite immunology*, 2011;33(4):250–254.
65. Wallach M, Smith C, Petracca M, Miller M, Eckert J, Braun R. *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens. *Vaccine*, 1995;13(4):347–354.
66. Wedrychowicz H. Antiparasitic DNA vaccines in 21st century. *Acta Parasitologica*, 2015;60(2):179-189.
67. World Health Organization (WHO), Echinococcosis fact sheet, Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>. 2020.
68. Xu J, Zhang Y, Tao J. Efficacy of a DNA vaccine carrying *Eimeria maxima* Gam56 antigen gene against coccidiosis in chickens. *The Korean journal of parasitology*, 2013;51(2):147–154.
69. Zhang W, Zhang Z, Shi B, Li J, You H, Tulson G, Dang X, Song Y, Yimiti T, Wang J, Jones K, McManus P. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. *The Journal of infectious diseases*, 2006;194(7):966–974.