

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

ESPECIALIDAD EN SALUD PÚBLICA VETERINARIA

TESINA

TÍTULO

“Estudio de Impacto de la aplicación de la vacuna EG95 en el hospedero definitivo e intermediario en distintos parajes de la provincia de Río Negro”

AUTOR: MV José Luis LABANCHI

FECHA DE ENTREGA: OCTUBRE 2018

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

ESPECIALIDAD EN SALUD PÚBLICA VETERINARIA

TESINA

TÍTULO

“Estudio de Impacto de la aplicación de la vacuna EG95 en el hospedero definitivo e intermediario en distintos parajes de la provincia de Río Negro”

AUTOR: MV José Luis LABANCHI

FECHA DE ENTREGA: OCTUBRE 2018

NOMBRE Y APELLIDO DEL DIRECTOR: Dr. Edmundo Juan LARRIEU

NOMBRE Y APELLIDO DEL CO-DIRECTOR: Dr. Roberto Otrosky

LUGAR DE REALIZACION DE LA TESINA: URESA ALTO VALLE ESTE -
GRAL ROCA- RIO NEGRO- PCI

FECHA DE REALIZACION DE LA TESINA: Enero a Julio de 2018

Agradecimientos

Al Dr. Edmundo Larrieu, quien supo impulsar y acompañar este trabajo.

Al Dr. Roberto Otrosky

A mi familia por su presencia incondicional y contenedora

**En especial a las comunidades de los parajes donde se desarrolló este trabajo,
como así también a mis compañeros y compañeras de Salud Pública.**

ÍNDICE

- RESUMEN** (Pág. IV)
- I. INTRODUCCIÓN** (Pág. 2)
- II. RESEÑA DEL PROGRAMA DE CONTROL EN RÍO NEGRO Y DE LA INTRODUCCIÓN DE LA VACUNA EG95** (Pág. 6)
- III. OBJETIVO** (Pág. 8)
- IV. MATERIALES Y MÉTODOS** (Pág. 9)
 - Área de trabajo** (Pág. 9)
 - Caracterización del ecosistema y aspectos socio-demográficos** (Pág.9)
 - Consideraciones acerca del funcionamiento del sistema de Salud** (Pág.10)
 - Esquema de vacunación** (Pág.11)
 - Diagnóstico inicial** (Pág. 12)
 - Test de arecolina** (Pág.14)
 - Test de Copro-ELISA** (Pág.15)
 - Registro de casos humanos** (Pág.16)
- V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO** (Pág. 16)
- VI. RESULTADOS** (Pág. 16)
- VII. DISCUSIÓN** (Pág. 21)
- VIII. CONCLUSION** (Pag. 23)
- IX. BIBLIOGRAFÍA** (Pág. 25)

RESUMEN

La equinococosis es una zoonosis parasitaria causada por la forma larval de los cestodos del género *Echinococcus*. Ésta es endémica en la provincia de Río Negro. El programa de control de la Equinococosis quística (EQ) en la provincia de Río Negro se puso en marcha en 1980. Basó sus acciones en la infraestructura de atención primaria de salud. La desparasitación sistemática de canes y la educación sanitaria fueron los pilares del programa de control. Si bien los índices disminuyeron significativamente la EQ sigue siendo hoy endémica en Río Negro. Es por esto que desde el 2009 se ha introducido la vacuna EG95 contra la hidatidosis ovina como nueva estrategia de control. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de la aplicación de la vacuna Eg95 en el hospedero definitivo (canino) e intermediario (ovino) en distintos parajes de la provincia de Río Negro con diferencias de estructura productiva, ecológica y aspectos socio sanitario. Para el cumplimiento del objetivo se utilizó en perros el test de arecolina y el test de CoproELISA, y para ovinos la visualización directa por necropsia con confirmación posterior por histología. Los primeros estudios de impacto en ovinos mostraron fuertes disminuciones de la prevalencia, del número de quistes por oveja y del número de productores con ovejas infectadas (69.6% a 21.1%, 1.4 a 0.3 y 84.2% a 22.2% respectivamente). Con relación a los perros, no hubo diferencias significativas al test de arecolina entre los estudios iniciales y de impacto (4.5% a 4.3%, $p > 0.05$), mientras que entre las distintas áreas se observaron diferencias significativas en el estudio de base ($p < 0.05$) pero no en el estudio de impacto ($p > 0.05$). De los resultados obtenidos se puede establecer un fuerte impacto de la vacuna Eg95 en huésped intermediario, no así en huésped definitivo.

I. INTRODUCCIÓN

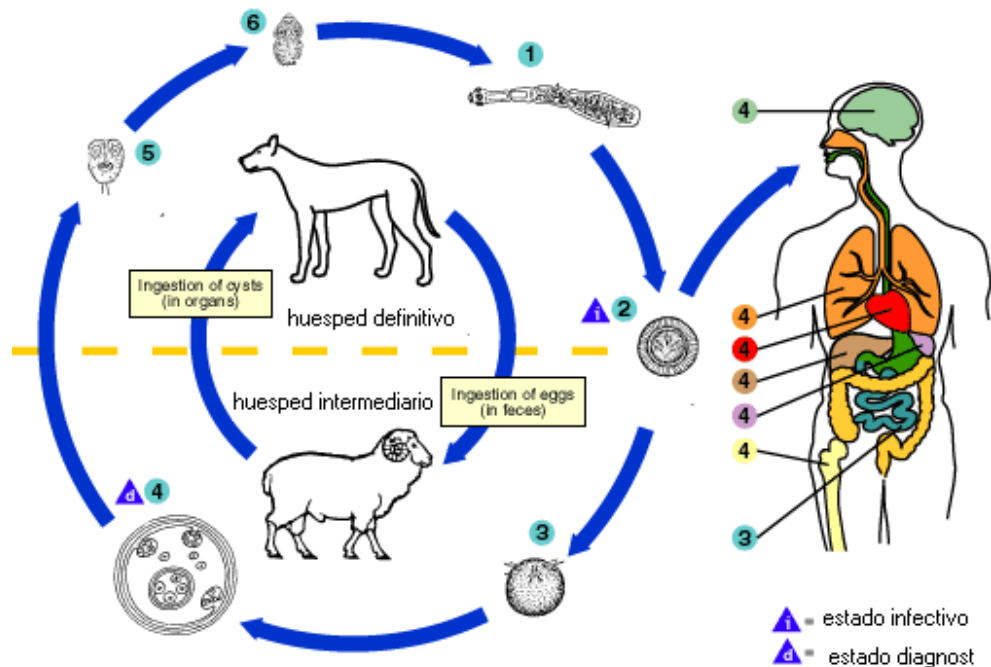
Las equinocosis (en sus formas quística, alveolar y poliquística) son un grupo de zoonosis causadas por las formas larvales de los cestodos parásitos del género *Echinococcus*. En particular, la equinocosis quística tiene como agente etiológico a *Echinococcus granulosus*, el cual desde una perspectiva taxonómica es actualmente considerado un complejo multi-especie denominado *E. granulosus sensu lato* (s.l.). Dicho complejo está formado por las especies *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) (genotipos G1/G2/G3), *E. equinus* (genotipo G4), *E. ortleppi* (genotipo G5), *E. canadensis* (genotipos G6/G7/G8/G9/G10) y *E. felidis* (cepa león). *E. granulosus s.s.* (particularmente el genotipo G1) es el que presenta la mayor distribución mundial y es responsable de aproximadamente el 80% de los casos humanos de EQ (Cucher *et al.*, 2016).

La EQ causa importante morbilidad, discapacidad y muerte en humanos si no es tratada. Persiste en la naturaleza por medio de un ciclo formado por los tres estadios evolutivos del parásito (huevo, larva o hidátide y adulto). La forma adulta parásita se presenta exclusivamente en los cánidos y, en general, no genera ninguna patología. Las larvas o hidátides se localizan en los órganos y tejidos de herbívoros y omnívoros (ovinos, bovinos, porcinos, equinos, camélidos sudamericanos y caprinos), provocando un deterioro en el animal y por lo tanto disminuyendo su productividad (Eckert *et al.*, 2002).

En la Provincia de Río Negro, Argentina, el sacrificio de ovinos adultos para consumo familiar, con liberación de las vísceras al medio ambiente (utilizadas para la alimentación de caninos) cierran el ciclo carnívoro-omnívoro, por lo que el hábito de realizar la faena familiar de carne de animales de pequeño porte es el principal factor de riesgo para la difusión de la enfermedad. Salas de faena de pequeños poblados, de malas condiciones sanitarias que permiten la salida de vísceras crudas del establecimiento y la muerte del hospedador portador en el campo, son otros mecanismos que permiten cerrar el ciclo de transmisión.

La infestación en el hombre ocurre tras la ingestión accidental de los huevos del parásito a través de agua y alimentos contaminados o por contacto directo con perros parasitados. Como consecuencia de esta diversidad de hospederos, la EQ incide sobre la salud pública, la salud animal y la economía rural (Guarnera, 2013)

Figura 1 – Ciclo del *Echinococcus granulosus*



Fuente: CDC <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Las áreas geográficas de mayor riesgo en Río Negro están ubicadas al oeste y al centro de la provincia (Larrieu *et al.*, 1986 ; Larrieu *et al.*, 2000) incluyendo las localidades de El Bolsón y San Carlos de Bariloche en la región cordillerana y las de Comallo, Pilcaniyeu, Ñorquinco e Ingeniero Jacobacci y sus áreas rurales en la región de la meseta patagónica, en donde las condiciones ecológicas favorecen la sobrevivencia de huevos de *E. granulosus* y las condiciones sociales, culturales y económicas generan un ambiente epidemiológico que favorecen el sustento del ciclo de transmisión (Larrieu *et al.*, 2002).

Entre los factores que contribuyen a la dinámica de la transmisión de *Echinococcus granulosus* en establecimientos ganaderos, aparte de los factores socio-ecológicos e intrínsecos de los huéspedes, se encuentran los factores extrínsecos como la temperatura, humedad ambiental y los agentes que dispersan los huevos del parásito desde las heces al ambiente (Gemmell *et al.*, 2001). Asimismo, la duración del efecto

climático estacional en la supervivencia de los huevos es el que entre otras cosas determina la dinámica de transmisión y prevalencia geográfica (Gemmell y col.2001).

En cuanto a la dispersión, la mayoría de los taenidos permanece dentro de los 180 metros (m) del lugar de deposición, pero algunos pueden dispersarse rápidamente sobre un área de más de 30000 hectáreas (ha) debido a la acción de factores climáticos como el viento y el agua, así también por algunos insectos y aves (Gemmell *et al.*, 2001). Los huevos de *Echinococcus granulosus* son muy resistentes a las condiciones climáticas pero, el clima cálido y seco, la heliofania prolongada y la radiación ultravioleta solar directa son los principales factores que inciden sobre su vitalidad (Guarnera, 2009). Incluso el cambio climático que provoca alteraciones en la temperatura y humedad del ambiente y/o suelo puede afectar la transmisión de *Echinococcus spp.* (Atkinson *et al.*, 2013).

El ambiente juega un importante rol en la dinámica de las enfermedades y así se refleja al formar parte de uno de los componentes de la triada ecológica. La influencia de factores ambientales (físicos, químicos y biológicos) influye en las tasas de crecimiento de poblaciones de vectores de enfermedades infecciosas como insectos y roedores, como así también en la supervivencia de los huevos de *Echinococcus spp.* (Atkinson *et al.*, 2013).

La descripción de las relaciones existentes entre la distribución geográfica de las enfermedades y los factores de riesgo ambientales y su análisis por medio de procedimientos estadísticos se denomina “Análisis Ecológico” (Kistemann *et al.*, 2002). Las características ambientales y climáticas más comúnmente usadas en estudios epidemiológicos de este tipo son, NDVI (Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada), cobertura y uso del suelo, elevación, pendiente, aspecto, capas geológicas, presencias de cuerpos de agua, temperatura, precipitaciones y humedad (Rinaldi *et al.*, 2006).

A partir de la aparición del Praziquantel los programas de control de la EQ se basaron en desparasitaciones caninas en forma sistemática cada 45-90 días con el objetivo de eliminar en cada ocasión las nuevas tenias antes que comiencen a eliminar huevos. La premisa era que en tanto la cobertura de la desparasitación sistemática se aproxima a la totalidad de la población de perros en un área determinada, el riesgo de infestación para el hombre y el ganado disminuye gradual y progresivamente hasta que

la transmisión se interrumpe por completo. La renovación de la totalidad de la población ovina por animales nacidos luego del cese de la transmisión daría lugar a la eliminación de *E. granulosus* (Gemmel *et al.*, 2001).

Sin embargo, luego de más de 30 años de uso de este antiparasitario, ningún área endémica ha alcanzado la fase de erradicación. La infraestructura requerida para llevar la droga a los perros 8 a 12 veces al año y durante un lapso prolongado de años (10 o más) no ha resultado sostenible por las regiones endémicas que, normalmente, se ubican entre las más pobres de cada país (Larrieu y Zanini, 2012).

En los últimos años se ha introducido la vacuna EG95 contra la hidatidosis ovina entre las opciones de control. Es una proteína recombinante clonada a partir de ARN obtenido de la oncósfera del parásito que, expresada como una proteína de fusión y aplicada junto con un adyuvante (originalmente Quil A), protege frente a la infestación por *E. granulosus* al inducir anticuerpos específicos contra la oncósfera del parásito. El parásito es eliminado cuando ocurre la infestación, antes de poder establecerse en los tejidos del huésped. Es una preparación proteica purificada, no infecciosa, no tóxica, no contaminante, producida mediante ingeniería genética, expresada en *Escherichia coli* (Lightowler *et al.*, 1999).

Se han efectuado varios estudios experimentales controlados en Australia, Nueva Zelanda, China y Argentina en rumiantes menores de menos de 25 semanas, no expuestos a la infestación por *E. granulosus*. Los animales fueron vacunados con EG95 y desafiados por vía oral con aproximadamente 2000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infectados, siendo entre los 8 y 14 meses de producida la infestación sacrificados bajo condiciones que permitieron el examen detallado de la res y de las vísceras, especialmente el hígado, los pulmones, los riñones, el bazo y el cerebro, que se cortaron en trozos de 1 a 2 mm, en búsqueda de quistes hidatídicos (Lightowlers *et al.*, 1999; Heath *et al.*, 2003).

Los resultados de todos los ensayos fueron similares con protecciones logradas en los animales vacunados respecto a los controles, entre 82% y 99%, para los ensayos con dos dosis de vacuna EG95 ,mientras que con 3 dosis se logró una protección del 97% (Lightowlers *et al.*, 1999; Heath *et al.*, 2003) .

Existe poca información sobre el impacto que podría producir su uso sistemático a campo y sobre los problemas operativos para su aplicación en forma masiva en

rebaños (Larrieu y Zanini, 2012; Larrieu *et al.*, 2013; Larrieu *et al.*, 2015; Larrieu *et al.*, 2017).

III. RESEÑA DEL PROGRAMA DE CONTROL EN RÍO NEGRO Y DE LA INTRODUCCIÓN DE LA VACUNA EG95.

El programa de control de la EQ en la Provincia de Río Negro se puso en marcha en 1980, cubriendo en 2 etapas 120.013 Km² de 7 departamentos provinciales (Fig.Nº2). Basó sus acciones en la infraestructura de atención primaria de salud. Así, agentes sanitarios llevaron a cabo la desparasitación de 11.500 perros inicialmente, con praziquantel en cada una de sus 4 rondas de visita domiciliaria, mientras que los veterinarios del programa de control fueron responsables de los sistemas de vigilancia de la EQ.

Ambos grupos fueron responsables asimismo de las estrategias de educación sanitaria dirigidas a los escolares y a los pobladores rurales. El monitoreo del programa se basó en la primera etapa, en la vigilancia de la infestación en perros mediante el test de arecolina, siendo reemplazada en 2003 por el test de coproantígenos/WB. Desde el comienzo del programa se efectuaron encuestas para la detección precoz de la EQ en las personas, especialmente en escolares de 7 a 14 años, inicialmente mediante serología (doble difusión 5, ELISA) asociada al tratamiento quirúrgico precoz, y, desde 1997, ultrasonografía (US) asociada a un esquema de tratamiento basada en albendazol.

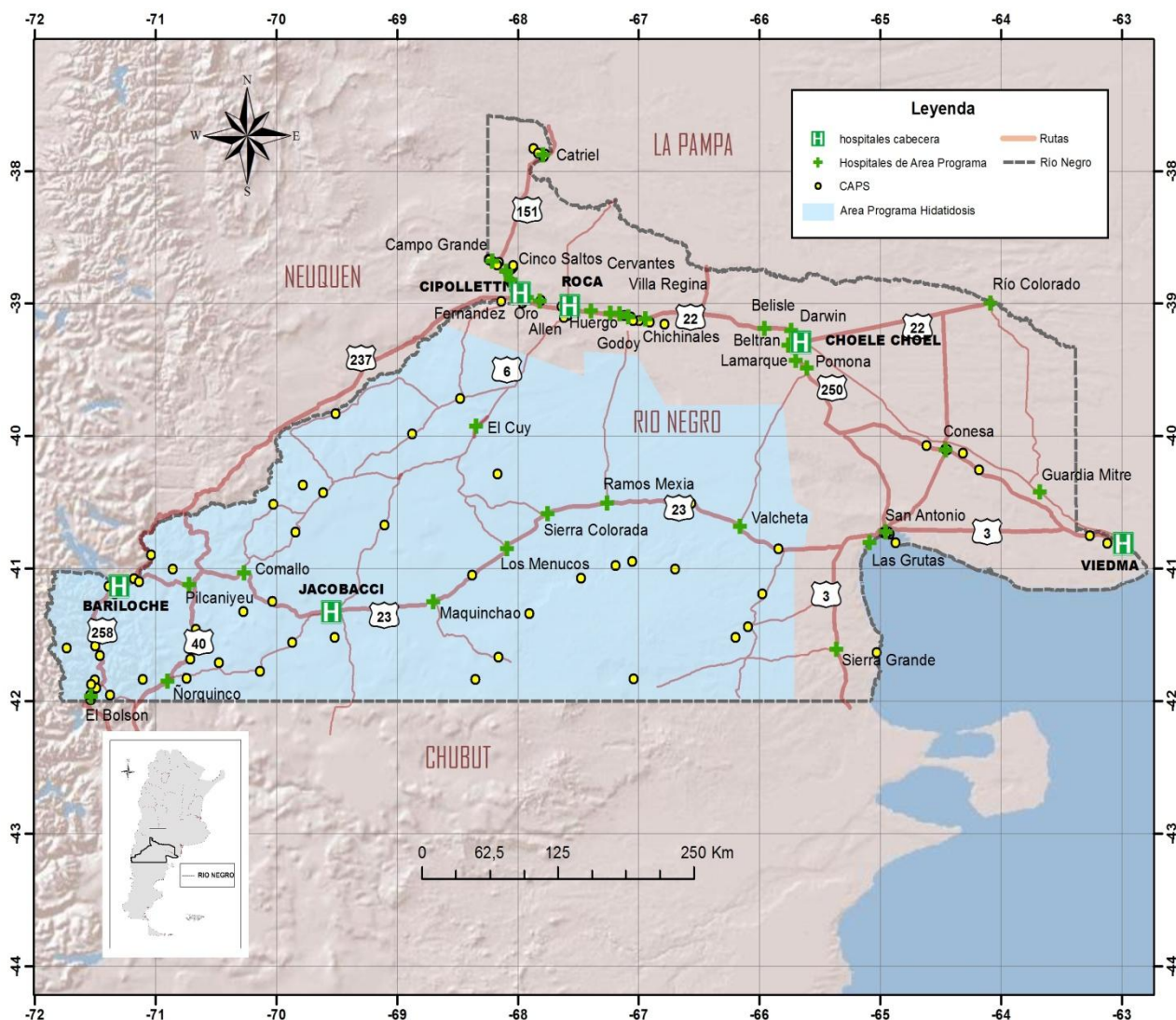
En 1980 la tasa de prevalencia en perros era del 41.5%, reduciéndose al 2.3% en 1997 y manteniéndose con ligeras fluctuaciones desde entonces hasta el 5.1% en 2003. Mediante test de coproantígenos, la prevalencia inicial de establecimientos ganaderos con transmisión presente en 2003 resultó del 13.6%, siendo del 13.3% en 2010; la diferencia entre el 1º y 2º estudio fue estadísticamente no significativa ($p>0.9$). En 1980 se notificaron 146 casos (tasa de incidencia 73 x 100000), mientras que en 1984-1986 las primeras encuestas con US en niños de 6-14 años mostraron una prevalencia del 5.6%. Para 1997 la tasa de incidencia se había reducido al 29 x 100000 y la tasa de prevalencia en encuestas con US en niños de 6 a 14 años al 1.1%. Actualmente la prevalencia en niños determinada mediante US es de 0.3% ($p<0.05$). Así, EQ sigue siendo endémica en la Provincia de Río Negro, manteniéndose tasas estables de infestación en perros, significativamente menores que al inicio del programa

y con disminución significativa de la transmisión a los seres humanos (Larrieu *et al.*, 2000)

Algunas de las regiones incluidas en el programa, que presentan condiciones ecológicas ideales para el sostenimiento del ciclo (Arezo, 2016) junto a condicionantes sociales marginales y con agregación de unidades productivas pequeñas con deficiencias de infraestructura sanitaria, generalmente constituyendo reservas de población originaria, concentraron la ocurrencia de casos nuevos en niños.

En 2009 se incorporó en estas regiones la vacunación de corderos con EG95, recibiendo éstos dos dosis seguidas de un refuerzo cuando los animales tenían 1-1.5 años de edad.

Figura N° 2 – Área bajo Programa de Control de Hidatidosis – Provincia de Ro Negro - Argentina



Fuente: Larrieu *et al.*, 2014. Cystic echinococcosis in dogs and children in the province of Río Negro, Argentina.

III. OBJETIVO

Evaluar el impacto de la aplicación de la vacuna EG95 en el hospedero definitivo (perro) e intermediario (ovino) en distintos parajes de la Provincia de Río Negro con diferencias de estructura productiva, ecológica y aspectos socio sanitario. Como aspectos secundarios se evalúa también la dinámica de la relación del sistema de salud con la comunidad.

IV. MATERIALES Y METODOS

Área de trabajo:

El área de trabajo está conformada por los parajes rurales Río Chico Abajo (Departamento Ñorquinco), Anecón Grande (Departamento Pilcaniyeu), Mamuel Choique (Departamento 25 de Mayo) y Nahuel Pan (Departamento Bariloche), ubicados en la Provincia de Río Negro, región patagónica, Argentina (Tabla 1, Figura 3), con una superficie aproximada de 1119 Km² y una población de 508 habitantes, población que ha disminuido significativamente en los últimos 20 años por fuertes procesos de migración a las áreas urbanas.

Al comienzo de la experiencia existían 79 productores de ganado ovino y/o caprino con un total de 8483 ovinos, todos ellos pequeños productores (promedio 104 ovejas por productor). Todas las áreas de trabajo están constituidas por población originaria mapuche, incluyendo 2 de ellas (Anecón Grande y Nahuel Pan) organizadas en forma de reserva, con un Lonco (cacique), responsable y una propiedad común de la tierra sin subdivisiones del terreno mediante alambrados.

Caracterización del ecosistema y aspectos socio-demográficos

El área de trabajo, a excepción de Nahuel Pan, presenta características de estepa patagónica, con escasas precipitaciones (casi exclusivamente en invierno), inviernos rigurosos y veranos muy cálidos. Nahuel Pan, por el contrario se ubica en la región cordillerana de los bosques andino patagónico donde las precipitaciones son abundantes. El clima y la escasa infraestructura vial limitan la accesibilidad al área de trabajo durante gran parte del otoño y el invierno. Las condiciones sociales y económicas son marginales y se basan en la ganadería ovina y caprina y en la existencia de planes sociales de sustentación. La infraestructura productiva en términos de corrales e instalaciones es paupérrima.

Existen algunas características productivas diferenciales entre las áreas de vacunación. Muchos productores de Río Chico Abajo tienen sus predios con costa de río lo que les permite tener algunas pasturas a partir de lo cual pueden comprar ovinos viejos con dientes rasados provenientes de zonas de secano con predominio de vegetación arbustiva que están al final de su vida productiva, logrando una o dos nuevas

esquilas y parición. Estos animales provienen de fuera de la zona de vacunación. En Nahuel Pan, asimismo, no existe manejo animal organizado, conviviendo ovejas y carneros todo el año por lo que no hay parición estacionada y en donde los perros también deambulan dentro y fuera de la reserva.

Durante el periodo de trabajo la región fue afectada por varios años de sequía extrema que culminaron con la erupción del volcán Puyehue de Chile que dejó un manto de cenizas volcánicas, generando ambos fenómenos una mortandad de animales cercana al 50% y una abrupta disminución del número de productores (58 productores en 2017).

Consideraciones acerca del funcionamiento del sistema de Salud

En cada paraje rural existe un Centro de Salud dependiente del Hospital Rural más cercano (de 30km a 90 km), que cuentan como personal único a un agente sanitario proveniente de la comunidad con tareas de visita domiciliaria a la población (incluyendo educación sanitaria y desparasitación de perros con praziquantel), complementado con una visita médica periódica efectuada desde el hospital rural (que incluye la ejecución de encuestas ultrasonográficas efectuadas por un médico generalista entrenado).

Las actividades de desparasitación de perros con Praziquantel y la búsqueda activa de casos (primero mediante serología y luego mediante ultrasonografía) son actividades del programa de control efectuadas desde 1980, actividades que se mantuvieron sin cambios al inicio y durante los 8 años de vacunación.

Existen diferencias operativas entre las formas de trabajo de agentes sanitarios. Por ejemplo, en Río Chico Abajo el agente sanitario efectúa visitas domiciliarias para repartir antiparasitarios en cuatriciclo, asegurando la ingestión del comprimido cubriendo éste con picadillo de carne. En Anecon Grande el agente recorre a caballo y deja los antiparasitarios a los dueños de los perros, que son responsables de la desparasitación. En Nahuel Pan, en los últimos años no hay agente sanitario y los pobladores deben concurrir al Centro de Salud a buscar los antiparasitarios, aunque el equipo veterinario desparasita en boca de perro 3 veces al año. En resumen, en general se desparasitaron 221 perros en cada ronda, de los cuales 143 reciben en forma directa los comprimidos y 78 reciben los comprimidos de sus dueños.

Esquema de vacunación

Para la vacunación se utilizó la vacuna EG95, elaborada por la Universidad de Melbourne, liofilizada y provista en frascos de 50 o 100 dosis junto a un adyuvante (Lightowers y col, 1996; Gaucci *et al.*, 2011).

La vacuna fue reconstituida con agua destilada y aplicada en forma subcutánea en la tabla del cuello, a la dosis de 50 ug de la proteína EG95 en un volumen de 2 ml.

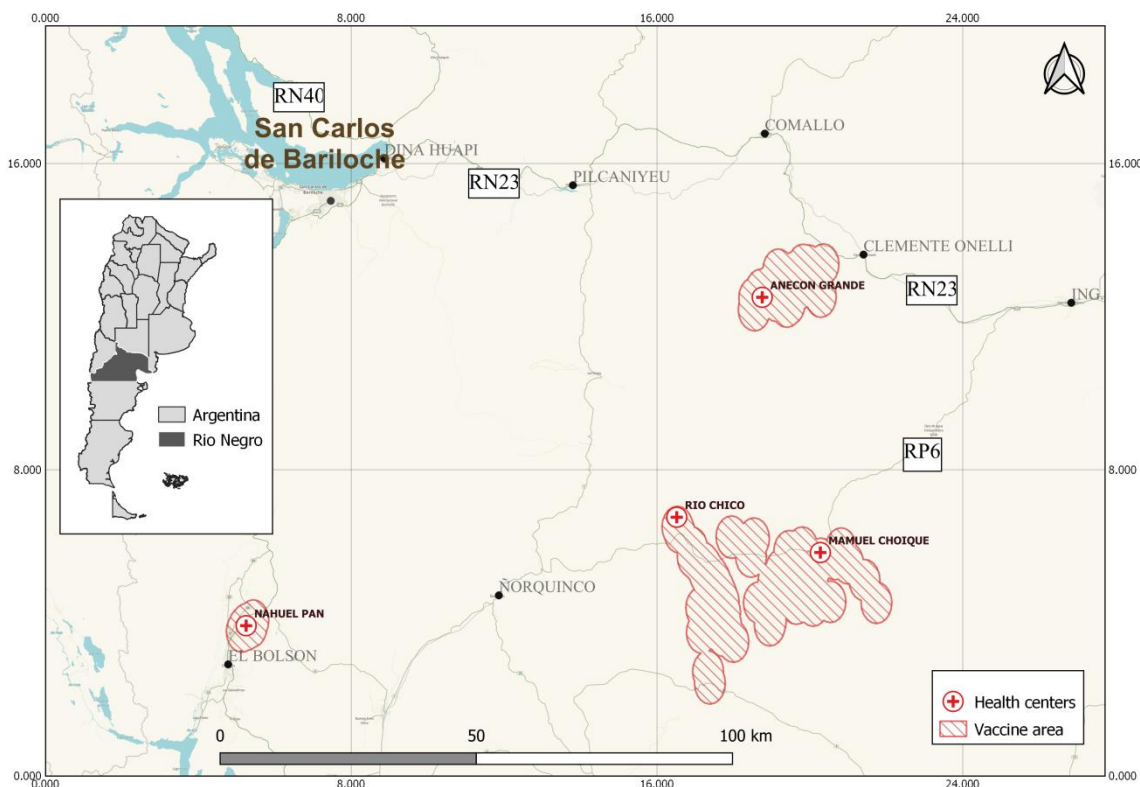
Se aplicaron 3 dosis a los corderos nacidos cada año. La primera dosis a los 30 días de edad en cercanía de la esquila, la segunda a los 60 días de edad en cercanía de la señalada y una tercera dosis de refuerzo al año de edad, aplicada en el mismo operativo de vacunación de la dosis 1 del segundo año. De tal forma los equipos de vacunación, integrados por personal veterinario del programa, asistieron a los parajes a vacunar durante 1 semana todos los meses de diciembre y enero a partir de 2009 (Larrieu *et al.*, 2013).

Este esquema de vacunación fue diseñado para alcanzar un potencial de 100% de inmunidad según las experiencias experimentales de uso de la vacuna (Heath *et al.*, 2003) minimizando los requerimientos de personal y movilidad para su aplicación. Atento a la circulación exclusiva de cepa G1 ovina y a los hábitos principales de faenamiento domiciliario de ovinos adultos se excluyeron las cabras del esquema de vacunación.

La sincronización para que los productores tuvieran sus rebaños encerrados el día de vacunación se efectuó mediante visitas domiciliarias previas del agente sanitario y aviso mediante radio Nacional AM.

Todos los animales vacunados fueron identificados con caravana, utilizándose cada año un color diferente. Por ende, cada animal con caravana recibió al menos 1 dosis de vacuna, sin existir identificación y/o registro individual del total de dosis recibidas por animal.

Fig. N° 3 - Vacuna Eg95 - Áreas de vacunación



Fuente: Larrieu *et al.* 2013. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data.

Diagnóstico inicial

Inicialmente se mantuvieron 2 reuniones informativas previas con la comunidad y su Lonco (jefe) relativas a las actividades a desarrollarse, incluyéndose información de inocuidad de la vacuna sobre animales y personas. Se efectuaron posteriormente visitas explicativas a cada una de las Unidades Epidemiológicas (UE) y a los efectos de recolectar información de censo de las especies animales presentes.

Se estableció una línea base de infestación en los distintos hospederos y en el ambiente con respecto a la cual medir el impacto de la introducción de la vacuna EG95, incluyendo métodos indirectos: CoproELISA como método tamiz con confirmación mediante Western Blot (WB) en materia fecal de perro (Guarnera *et al.*, 2000; Cavagión *et al.*, 2005), Elisa como prueba tamiz con confirmación mediante WB en suero de ovinos (Gatti *et al.*, 2007) y PCR en muestras de tierra de las UE (Cabrera *et al.*, 2002) y métodos directos para visualización del parásito: necropsias en ovinos adultos con

confirmación diagnóstica mediante histología (Cabrera *et al.*, 2003) y test de arecolina en perros (Perez *et al.*, 2006).

La selección de las (UE) a ser evaluadas se efectuó mediante un muestreo simple randomizado y estadísticamente representativo con un 95% de confianza y un 20% de margen de error, siendo seleccionados 109 productores. El test de arecolina se aplicó en concentraciones caninas con concurrencia voluntaria de sus dueños (no aleatorizado).

CoproELISA/WB: los procedimientos para la toma de muestras de heces caninas y su procesado incluyeron una porción de heces de canes que estuviera dispersa en el suelo de una UE la cual fue recogida evitando la contaminación excesiva con tierra, pastos u otros contaminantes del suelo. El número de muestras a obtenerse fue de una (1) muestra cada dos (2) perros existentes en el establecimiento. Este estudio es para establecer si una UE se clasifica como “infectada” o no, sin importar a que perro pertenece la muestra analizada. Se recogieron individualmente en envases plásticos secos y limpios con tapa a rosca, sin conservante, siendo enviadas inmediatamente al laboratorio de Salud Ambiental de San Carlos de Bariloche para ser procesadas mediante CoproELISA. Las muestras positivas fueron remitidas al Instituto Nacional de Microbiología ANLIS/MALBRAN para su confirmación mediante WB, según técnicas descriptas (Guarnera *et al.*, 2000). La presencia de una muestra positiva clasifica a la UE como infectada.

ELISA/WB: de borregos vivos de 2-4 dientes se obtuvo 10 cc de sangre de la vena yugular, de animales sujetos en posición de pie y con la cabeza fijada lateralmente, utilizándose agujas 25/8 y jeringas plásticas descartables. El suero se extrajo mediante centrifugación, se conservó refrigerado entre 5°C y 8°C hasta su remisión al laboratorio de Zoonosis de Viedma (Río Negro) en donde se mantuvo en freezer a -20°C hasta su procesado. Las muestras fueron procesadas mediante Elisa, según técnicas descriptas (Gatti *et al.*, 2007). Las muestras positivas se remitieron al Instituto Nacional de Microbiología ANLIS/MALBRAN para su confirmación mediante WB (Gatti *et al.*, 2007).

PCR: en las UE se obtuvieron muestras superficiales de tierra del patio, tomadas del sitio donde suelen dormir los perros (300 g, por vivienda). La tierra se conservó en estado natural en bolsas de polietileno o frascos secos y limpios con tapa a rosca, siendo

procesadas en el Instituto Nacional de Microbiología ANLIS-MALBRÁN según técnicas descriptas (Cabrera *et al.*, 2002).

Necropsia: se aplicó en capones de 6 años de edad aproximadamente, los cuales resultaron especialmente adquiridos en las UE, siendo sacrificados y faenados en el Matadero Municipal de Ingeniero Jacobacci, el cual fue dedicado ese día exclusivamente a esta actividad, siendo controlado el proceso de sacrificio, faena, pesado de carcasas y análisis de vísceras y reses por veterinarios especializados del programa de control. Los animales que presentaron al menos 1 quiste hialino patognomónico, fueron clasificados como parasitados. Los que solo presentaron quistes supurados o calcificados, fueron expurgados y remitidos a histología para confirmación del diagnóstico.

Test de arecolina: se efectuaron 5 concentraciones caninas, una por comunidad, observándose las deposiciones de los perros en bandeja de fondo oscuro lo que permite una visualización directa del parásito. (Pérez *et al.*, 2006).

Para el cumplimiento del objetivo se diseñó una evaluación de campo utilizando los mismos parámetros que para el diagnóstico inicial. Así se utilizó para evaluación en perros el test de arecolina y el test de CoproELISA y para ovinos visualización directa por necropsia con confirmación posterior por histología (Cabrera *et al.*, 2003).

En cuanto al tamaño de la muestra para el test de arecolina, se estableció la meta de muestrear al 100 % de los perros en el área de trabajo. En este aspecto se realizó el test de arecolina en todos los perros que se encontraban en la UE.

Test de Arecolina:

Esta técnica se basa en el análisis de materia fecal canina en UE, obtenida luego de la dosificación de perros con bromhidrato de arecolina. Este es un parasimpaticomimético que provoca el incremento del tono intestinal y la movilidad del músculo liso, y este efecto es el responsable de la purga. El hígado es el lugar principal de detoxificación. La arecolina también ejerce una acción directa sobre el propio gusano, causa su parálisis, pero no la muerte, y así provoca que se relaje su fijación sobre la pared intestinal. Por tanto, se debe administrar por vía oral. La purgación consecuente expulsa a los parásitos con las heces. (Pérez *et al.*, 2006)

Se aplicó el tenífugo bromhidrato de arecolina al 1% a la dosis de 4 mg/kg.

Unidad de Observación: perro.

Interpretación de resultados: visualización de *Echinococcus granulosus*: perro parasitado.

Estrategia: Se dosificaron a todos los perros con arecolina en cada UE.

En todos los casos se mantuvieron criterios de bioseguridad para el personal y el ambiente.

Test de Copro-ELISA

Esta técnica consiste en la búsqueda de antígeno de tenia spp. en materia fecal de perro. Las muestras de materia fecal inactivadas se procesan mediante Copro-ELISA, que en forma resumida incluye la mezcla enérgica de la materia fecal en partes iguales con PBS-Tween 0.3%, sensibilización de las placas de ELISA con suero anti-*E. granulosus* de conejo, siembra de 0.50 mg de solución de materia fecal, agregado de 100 ul de conjugado anti-*E. granulosus* marcado con peroxidasa y 100 ul de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] como substrato revelador; la lectura se efectúa a 405-410 nm.

Se recoge una porción de heces de canes que hayan reaccionado a la administración de arecolina, cuando esto no sucedió se recogieron muestras dispersas del suelo de la UE. La recolección se hace evitando la contaminación excesiva con tierra, pasto u otros contaminantes del suelo. El número de muestras que se obtuvieron fueron de una (1) muestra cada dos (2) perros existentes en la UE.

Se recogieron individualmente en bolsas plásticas, sin conservante, siendo enviadas inmediatamente al laboratorio de zoonosis de Salud Ambiental de San Carlos de Bariloche, según las normas generales de transporte para material biológico. Una vez recibidas en el laboratorio se congelan a -80° C por 48 horas o durante una semana a -20°C con el fin de inactivar los huevos de *E. granulosus*.

Las muestras así inactivadas fueron remitidas al Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS-MALBRÁN, para ser sometidas a la prueba de Copro ELISA (Guarnera *et al.*, 2000).

La presencia de una muestra positiva clasifica a la UE como infectada.

Registro de casos humanos

Paralelamente, el programa de control mantuvo el registro de casos humanos nuevos, mediante vigilancia pasiva en base a la notificación médica obligatoria (casos sintomáticos) y mediante vigilancia activa identificando portadores asintomáticos en encuestas con ultrasonografía (Perez col, 2006; Larrieu *et al*, 2011)

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados se efectuó con EPIDAT 3.1 estimándose proporciones y sus intervalos de confianza del 95%, Chi cuadrado de asociación con un nivel de significación de $p < 0.05$ para cada una de las técnicas analíticas utilizadas para comparar prevalencia de la infestación antes de la vacunación y al final del período de trabajo y test de PEARSON para las comparaciones entre áreas rurales.

VI. RESULTADOS

En el área de trabajo, el número de productores disminuyó entre el 2009 - 2017 de 79 a 58, mientras que las poblaciones ovinas disminuyeron de 8483 cabezas a 3898 y la de perros de 309 a 221 siendo en Mamuel Choique donde se registro la mayor merma (de 41 a 12 perros) (tabla 1).

Se aplicaron 29323 dosis de vacuna entre diciembre de 2009 y enero de 2017, correspondiendo 17894 a Río Chico, 1056 a Nahuel Pan, 2220 a Mamuel Choique y 8153 a Anecón Grande; con una cobertura de vacunación del 83.5% en la dosis 1, 80.1% en la dosis 2 y 85.7% en la dosis 3, estimándose la cobertura como la proporción de corderos vacunados en el periodo de trabajo en relación a los corderos existentes en el mismo periodo (Tabla 2).

Los primeros estudios de impacto, basados en necropsia de ovinos adultos (Larrieu *et al*, 2015) mostraron fuertes disminuciones de la prevalencia, del número de quistes por oveja y del número de productores con ovejas infectadas (69.6% a 21.1%, 1.4 a 0.3 y 84.2% a 22.2% respectivamente (Tabla 3), resultando las diferencias en la proporción de productores con ovejas infectadas estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Las diferencias en la prevalencia entre las distintas áreas de trabajo y las diferencias en el número de productores infectados resultaron no significativas ($p > 0.05$) en ambos estudios.

En relación a los perros, al test de arecolina no hubo diferencias significativas entre los estudios iniciales y de impacto (4.5% a 4,3%, $p>0.05$), mientras que entre las distintas áreas se observaron diferencias significativas en el estudio de base ($p<0.05$) pero no en el estudio de impacto ($p>0.05$).

Utilizando CoproELISA con confirmación por Western Blot se observaron diferencias estadísticas significativas en la proporción de muestras positivas entre los estudios base/impacto ($p>0.05$), no así en el número de productores con muestras positivas ($p>0.05$).

En las poblaciones humanas, en el periodo 1995 a 2016 se identificaron 39 casos nuevos lo que indica que el 7.8% de los habitantes han tenido un quiste hidatídico durante su vida. De ellos, 22 correspondieron a Río Chico, 12 a Anecon Grande y 5 a Mamuel Choique. Específicamente en niños menores de 15 años, en el periodo 2006-2016 se identificaron 8 casos, correspondiendo 3 a Río Chico y 6 a Anecon Grande de los cuales solo 1 fue identificado en el periodo 2015-2016 correspondiendo a un quiste pulmonar de 10 cm (probablemente infestación anterior al proceso de aplicación de la vacuna EG95).

Tabla 1. Diagnóstico de situación al inicio del programa de vacunación y a los 8 años de trabajo. Río Negro, 2009-2017

Área	Productores ovinos*	Ovejas	Ovejas por productor	Cabras	Perros	Perros por productor	Habitantes	Lat/Long	Km ²	Productores por Km ²
	2009/2017	2009/2017	2009/2017	2009/2017	2009/2017	2009/2017	2017			2009/2017
Río Chico Abajo	41/36	5012/2663	122/74	6034/2899	173/143	4/4	325	-41.7098 -70.4761	312	0.13/0.11
Nahuel Pan	13/8	205/132	16/17	0/75	48/36	4/4	45	-41.9004 -71.4932	63	4.8/12.7
Mamuel Choique	11/3	1306/205	100/68	2508/580	41/12	3/4	80	-41.7777 -70.1369	496	0.02/0.6
Anecón Grande	13/11	1880/898	145/82	1324/370	46/30	3/3	58	-41.3215 -70.2742	248	0.05/0.04
Total	79/58	8483/3898	104/67	9866/3934	309/221	4/4	508		1119	0.07/0.05

Tabla 2. Dosis de vacuna EG95 aplicadas y cobertura alcanzada. Río Negro, 2009-2017

Área	Dosis 1	Cobertura* (%)	Dosis 2	Cobertura* (%)	Dosis 3	Cobertura* (%)	Total
Río Chico Abajo	8039	88,1	6423	80,1	3432	85,6	17894
Nahuel Pan	449	69,1	379	75,8	228	91,2	1056
Mamuel Choique	1010	72,7	838	94,2	372	83,6	2220
Anecón Grande	3356	87,6	3091	92,8	1706	89,1	8153
Total	12854	83,5	10731	80,1	5738	85,7	29323

*Cobertura: suma de corderos vacunados en los años de trabajo/ suma de corderos existentes en el periodo de trabajo * 100

Tabla 3. *E. granulosus* prevalencia inicial (base) y seguimiento (impacto) de ovejas vacunadas con EG95. Río Negro, 2009/2017

Área	Estudio	Ovejas positivas por necropsia** n + %* CI95%	Productores con ovejas infectadas por necropsia** n + %* CI95%	Test de Arecolina *** En perros n + %* CI95%	Perros positivos por CoproELISA*** n + %* CI95%	Productores con perros infectados por coproELISA*** n + %* CI95%
Río Chico	Base	13 9 69.2	6 5 83.3	27 0 0.0	54 6 11.1	25 6 24.0
	Impacto p value	14 4 28.6	12 4 33.3 0.04	34 1 2.9	49 1 2.0 0.06	17 1 5.9 0.12
Nahuel Pan	Base			21 1 4.8	29 2 6.9	16 2 12.5
	Impacto p value			29 2 6.9 0.7	31 2 6.5 0.9	9 2 22.2 0.5
Mamuel Choique	Base	18 8 44.4	8 6 75.0	25 0 0.0	16 1 6.3	9 1 11.1
	Impacto p value	2 0 0.0	3 0 0.0 0.02	20 0 0.0	20 0 0.0 0.25	5 0 0.0 0.4
Anecón Grande	Base	15 15 100	5 5 100	16 3 18.8	26 3 11.5	9 3 33.3
	Impacto p value	3 0 0.0	3 0 0.0 0.004	33 2 6.) 0.16	36 2 5.6 0.34	14 1 7.1 0.1
Total	Base	46 32 69.6 55-83	19 16 84.2 60-97	89 4 4.5 1-11	125 12 9.6 4-15	59 12 20.3 9-31
	Impacto	19 4 21.1 6-45	18 4 22.2 6-/47	116 5 4.3 1-10	136 5 3.7 1-8	45 4 8.9 2-21
	p value	0.003	0.0002	0.8	0.04	0.1
	p1 value		0.1/0.1	0.006/0.7	0.8/0.6	0.5/0.8

n= total de muestras tested, += muestras positivas % positivas. ** 2009 estudio base, 2016 estudio de impacto. *** 2009 estudio base, 2017 estudio de impacto. p valúe muestra diferencias entre base/impacto. p1 valúe muestra diferencias entre 4 áreas en ambos estudios

VII. DISCUSIÓN

Un primer análisis sobre los resultados de la Tabla 3 indica que el impacto de la vacuna Eg95 fue muy significativo en relación a la infestación en el huésped intermediario (oveja). Un valor $p=0.003$ ($p<0.05$) en ovejas infectadas y de $p=0.0002$ ($p<0.05$) en productores con ovejas infectadas para diferencias entre base/impacto, muestra un fuerte impacto de la vacuna ovina para este estudio. No así en relación al huésped definitivo (perro) donde los resultados para productores con perros infectados y test de arecolina en perros fue no significativo ($p>0.05$), aunque el estudio de muestras positivas por CoproELISA/WB dio significativo con un $p<0.05$.

Torgerson (2003) desarrolló un modelo matemático para simular el impacto de diferentes opciones de control de Equinocosis quística en circunstancias en las que se estaba produciendo transmisión entre perros domésticos y ovejas. Este modelo relaciona la situación inicial de la dinámica de transmisión de la enfermedad con distintas intervenciones o combinaciones de estas y proyecta a través de un modelo matemático, el impacto que tendrá en el programa de control. Aplicando este modelo en el caso de la experiencia de Río Negro podrían requerirse 15 años de vacunación para alcanzar una disminución de la prevalencia en perros y alcanzar el control efectivo que interrumpa el ciclo del parásito y que impacte en la salud de la comunidad.

En el presente estudio, los ovinos se vacunaron con una cobertura cercana al 85% para cada dosis. Se consideró que la vacunación completa implicaba dos inmunizaciones en corderos y una vacunación adicional cuando los animales tenían aproximadamente 1 año de edad. De esta manera, tres inmunizaciones con una tasa de cobertura de alrededor del 85% para cada dosis representan un cumplimiento efectivo de todo el esquema de vacunación de alrededor del 61%. El tratamiento con praziquantel en perros se especificó y efectivizó en 4 ocasiones por año, aunque la cobertura probablemente no llegó al 75% en cada ronda. Con una prevalencia inicial de infestación en ovejas que representa una endemicidad extrema (casi 50%), pero una prevalencia proporcionalmente baja de infestación en perros (alrededor del 5%), las suposiciones del modelo parecen cumplirse con una prevalencia de infestación en ovejas en 7 años cercana al 20%, lo que permite mantener el ciclo de transmisión entre ovinos que no han completado su esquema de vacunación y perros insuficientemente

desparasitados, pero con expectativas de mantener una tendencia hacia el control efectivo después de 15 años de actividades.

Otro aspecto a destacar del estudio es que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos parajes tanto para los estudios de base como para los de impacto. Solo se encontró diferencias significativas entre las áreas de trabajo en relación al estudio base del Test de Arecolina. Se puede inferir que para este estudio las diferencias descritas en relación al ecosistema, manejo de la majada, división del territorio, comunicaciones, no tuvieron incidencia tanto en el comienzo del estudio como en el transcurso del mismo. En este sentido merece un párrafo aparte las diferencias en las intervenciones del sistema de salud en las distintas comunidades. Hay agentes sanitarios que realizan rondas de visita domiciliaria con cierta periodicidad, otros permanecen en el puesto sanitario y salen poco a terreno y lugares donde no hay agente sanitario; las diferencias también se dan en la acción de desparasitar perros, mientras que están los agentes sanitarios que desparasitan en boca con uso de paté otros entregan los comprimidos para que el propietario lo administre , otros propietarios directamente van a buscar el antiparasitario al puesto sanitario más cercano ya que nadie los visita periódicamente salvo alguna ronda esporádica del equipo de salud. Estos aspectos tampoco reflejaron diferencias significativas entre las áreas en estudio.

En cuanto a la infestación en los perros hallados positivos al test de arecolina podrían deberse a factores de riesgo asociados al manejo de los animales y no inherentes a la vacuna (adquisición de ovinos no vacunados, capacidad de los perros de deambular y alimentarse fuera de la zona de vacunación) y en un caso, no se pudo verificar si estuvo ligado al faenamiento de caprinos no incluidos en la vacunación (lo que plantearía dudas sobre la pertinencia de no incluirlos en la vacunación por razones de costo, operatividad y bajo impacto epidemiológico) o de ovinos viejos no vacunados o insuficientemente vacunados. En relación a este último aspecto, algunos de los ovinos hallados positivos en esta experiencia, e identificados como con al menos 1 dosis de vacuna aplicada (por estar identificados con caravana), podrían no haber recibido las 3 dosis completas, o haber recibido su primera dosis en forma tardía.

Las cabras no fueron incluidas en el programa de vacunación por razones de tiempo, operabilidad y asumiendo el bajo impacto epidemiológico de la equinocosis en cabras en el área. Un perro que se encontró infectado con *E. granulosus* provino de

un campo donde el propietario solo tenía cabras, sin embargo, él compra ovejas para el sacrificio doméstico a los vecinos y, por lo tanto, la fuente de la infestación en ese perro no está clara.

Se reconoce que desde el desarrollo del praziquantel a principios de la década de 1980 como un agente antiparasitario contra el *E. granulosus*, existe una herramienta efectiva para controlar la enfermedad. Sin embargo, los éxitos alcanzados usando el tratamiento del perro como la única herramienta de control importante han sido limitados en muchas áreas del mundo. Es probable que esto se asocie con las dificultades para tener la logística y los medios para desparasitar efectivamente al 100% de los perros con una frecuencia de 8 veces por año durante más de 10 años en áreas rurales remotas de difícil acceso (Larrieu y Zanini, 2012).

VIII. CONCLUSIÓN

La vacunación de ovejas es una nueva herramienta efectiva, aunque presenta algunos de los mismos desafíos que el uso de praziquantel, es decir, la necesidad de contar con logística y medios para vacunar dos veces al año en áreas rurales remotas. Aunque los recursos solo se requieren dos veces al año, en comparación con 4 a 12 veces al año en los programas de desparasitación, la cantidad de animales involucrados es mucho mayor en el caso de la vacunación.

Se ha predicho que la combinación de ambos tratamientos caninos y la vacunación del ganado logrará mejores resultados para detener la transmisión de la enfermedad (Torgerson, 2003).

Del presente trabajo se desprende en referencia a la vacuna, que es necesario mejorar la cobertura (% de vacunados) y buscar aquella logística viable que permita su inclusión como herramienta de control de forma masiva a todas las áreas bajo programa.

En cuanto a la desparasitación de perros con praziquantel si bien se reconoce la necesidad de mejorar la cobertura se visualiza que la cantidad de animales a intervenir son mucho menores y es más sencilla la aplicación del tratamiento antiparasitario.

En el programa Río Negro, en base a los hallazgos de este estudio, y debido a las dificultades prácticas para mejorar la cobertura de vacunación, se decidió incorporar 2 tratamientos antiparasitarios por año por los veterinarios del programa sumados a las

desparasitaciones que habitualmente realizan los agentes sanitarios, buscando así mejorar el impacto combinado de la vacunación de las ovejas y la desparasitación de los perros.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Arezo M. (2016). Análisis ecológico de la ocurrencia de casos de hidatidosis en la Provincia de Río Negro. Instituto de Altos Estudios Espaciales "Mario Gulich". <http://aulavirtual.ig.conae.gov.ar/moodle/mod/page/view.php?id=193>.

Atkinson J. A. M., Gray D. J., Clements A. C., Barnes T. S., McManus D. P., Yang Y. R. (2013). Environmental changes impacting Echinococcus transmission: research to support predictive surveillance and control. *Glob. Chang. Biol.* 19(3): 677-688.

Cabrera M., Canova S., Rosenzvit M., Guarnera E. (2002). Identification of Echinococcus granulosus eggs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44:29-34.

Cabrera P.A., Irabedra P., Orlando D., Rista L., Haran G., Viñals G., Blanco M.T., Alvarez M., Elola S., Morosoli D., Moraña A., Bondad M., Sambrán Y., Heinzen T., Chans L., Piñeyro L., Perez D., Pereyra .(2003). I. National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants Ovis aries as an indicator in control programmes in Uruguay. *Acta Trop.* 85:281-285.

Cavagion L., Pérez A., Santillán G., Zanini F., Jensen O., Saldia L., Diaz M., Cantoni G., Herrero E., Costa M.T., Volpe M., Araya D., Alvarez Rubianes N., Aguado C., Meglia G., Guarnera E., Larrieu E. (2005). Diagnosis of cystic echinococcosis on sheep farms in the south of Argentina: areas with a control program. *Vet. Parasitol.* 128:73-81.

Cucher M.A., Macchiaroli N., Baldi G., Camicia F, Prada L., Maldonado L., Avila H.G., Fox A., Gutiérrez A., Negro P., López R., Jensen O., Rosenzvit M., Kamenetzky L. (2016). Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Trop. Med. Int. Health.* 21(2):166-75.

Eckert J., Gemmell M.A., Meslin F.X., Pawłowski Z.S. (2002). *Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*. WHO/OIE, France, 272 pp.

Gatti A., Alvarez R., Araya D., Herrero E., Costa M., Mancini S., Santillan G., Larrieu E. (2007). Ovine Echinococcosis: I. Immunological Diagnosis by Enzyme Immuno Assay. *Vet. Parasitol.* 117:112-121.

Gaucci C.G., Jenkins D., Lightowlers M.W. (2011). Strategies for optimal expression of vaccine antigens from taeniid cestode parasites in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.* 48:277-289.

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., Pawłowski Z.) 195-203 WHO/OIE. France.

Guarnera E., Santillan G., Botinelli R., Franco A. (2000). Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. *Vet. Parasitol.* 88:131-134.

Guarnera E.A. (2009). Hidatidosis en Argentina: carga de enfermedad. In Hidatidosis en Argentina: Carga de enfermedad. *Organización Panamericana de la Salud*.

Guarnera E.A. (2013). La echinococcosis quística en la interfase salud humana/animal/medio ambiente. *Ministerio de Salud*, Buenos Aires, Argentina.

Heath D.D., Jensen O., Lightowlers M.W. (2003). Progress in control of hydatidosis using vaccination – a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta Trop.* 85:133.

Kistemann T., Dangendorf F., Schweikart J. (2002). New perspectives on the use of Geographical Information Systems (GIS) in environmental health sciences. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205(3): 169-181.

Larrieu E., Lester, R., Jauregui, j., Odriozzola M., Agüero A.(1986). Epidemiología de la hidatidosis humana en la Provincia de Río Negro. *Acta Gastroent. Lat. Amer.* 16: 93-108

Larrieu E., Costa M. T., Cantoni G., Labanchi J.L., Bigatti R., Pérez A. & Romeo S. (2000). Control program of hydatid disease in the province of Río Negro, Argentina. 1980-1997. *Bol. Chil. Parasitol.* 55(3/4): 49-53

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., Mercapide C.H., Salvitti J.C., Sustercic J., Moguilensky J., Panomarenko H., Uchiumi L., Herrero E., Talmon G., Volpe M., Araya D., Mujica G., Mancini S., Labanchi J.L., Odriozola M. (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: 1-5.

Larrieu E., Zanini F. (2012). Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and Praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev. Panam. Salud Pública.* 31(1): 81-87.

Larrieu E., Herrero E., Mujica G., Labanchi J.L., Araya D., Grismado C., Calabro A., Talmon G., Ruesta G., Perez A., Gatti A., Santillán G., Cabrera M., Arezzo M., Seleiman M., Cavagión L., Cachau M.G., Alvarez Rojas C.A., Gino L., Gauci C.G., Heath D.D., Lamberti R., Lightowlers M.W. (2013). Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data. *Acta Trop.* 127(2):143-51.

Larrieu E., Seleiman M., Herrero E., Mujica G., Labanchi J.L., Araya D., Grizmado C., Sepúlveda L., Calabro A., Talmón G., Crowley P., Albarracín S., Arezo M., Volpe M., Avila A., Pérez A., Uchiumi L., Salvitti J.C., Santillan G.(2014). Cystic echinococcosis in dogs and children in the province of Río Negro, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2014 Apr-Jun. 46(2):91-7.

Larrieu E., Mujica G., Gauci C.G., Vizcaychipi K., Seleiman M., Herrero E., Labanchi J.L., Araya D., Sepúlveda L., Grizmado C., Calabro A., Talmon G., Poggio T.V., Crowley P., Cespedes G., Santillán G., García Cachau M., Lamberti R., Gino L., Donadeu M., Lightowlers M.W.(2015). Pilot Field Trial of the EG95 Vaccine Against Ovine Cystic Echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 30:9(10) - e0004134.

Larrieu E., Poggio T.V., Mujica G., Gauci C.G., Labanchi J.L., Herrero E., Araya D., Grizmado C., Calabro A., Talmon G., Crowley P., Santillán G., Vizcaychipi K., Seleiman M., Sepulveda L., Arezo M., Cachau M.G., Lamberti R., Molina L., Gino L., Donadeu M., Lightowlers M.W.(2017). Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Humoral response to the vaccine. *Parasitol Int.* Jun; 66(3):258-261.

Lightowlers M.W., Lawrence S.B., Gauci C.G., Young J., Ralston M.J., Maas D., Heath D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol.* 18:457-462.

Lightowlers M.W., Jensen O., Fernandez E., Iriarte J., Wollard D., Gauci C., Jenkins D., Heath D. (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int. J. Parasitol.* 29:531-534

Perez A., Costa M.T., Cantoni G., Mancini S., Mercapide C., Herrero E., Volpe M., Araya D., Talmon G., Chiosso C., Vazquez G., Del Carpio M., Santillan G., Larrieu E. (2006). Vigilancia epidemiológica de la equinococosis quística en perros, establecimientos ganaderos y poblaciones humanas en la Provincia de Río Negro. *Medicina (Bs As)*. 66:193-200.

Rinaldi L., Musella V., Biggeri A., Cringoli G. (2006). New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. *Geospat. Health*. 1(1): 33-47.

Torgerson PR. (2003). The use of mathematical models to simulate control options for echinococcosis. *Acta Trop*. 85: 211-21.