

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**TITULO: CICLO VITAL DE LOS PARAMPHISTOMIDOS DE RUMIANTES EN
REGIONES TEMPLADAS DE LA REPÚBLICA ARGENTINA**

AUTOR: Med. Vet. SANABRIA, RODRIGO EDUARDO FABRIZIO.

DIRECTOR: DR. ROMERO, JORGE ROBERTO.

CO-DIRECTOR: DRA. RUMI, ALEJANDRA

Lugar de trabajo: Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias -
CEDIVE - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de La Plata

Miembros del Jurado:

Dra. Venturini, Lucila

Dr. Entrocasso, Carlos

Dr. Steffan, Pedro

Año 2011

Dedicatoria:

A mi esposa Andrea y mis hijos Milagros, Bautista y Simón. Son ellos quienes dan sentido a los desafíos, y a los momentos que mas agradezco de esta vida.

A mi viejo y a mi abuelo José, aunque estén lejos, esto también es un regalo para ustedes.

Agradecimientos:

A mis padres y a mis abuelos por haberme inculcado desde siempre, la admiración por los animales, que me llevó a estudiar esta profesión, que tantos caminos tiene.

A Jorge, por darme la oportunidad de trabajar en el CEDIVE, y enseñarme a ver las cosas de diversas formas. Sin duda me ha ayudado a madurar y crecer en lo profesional y lo personal.

A Alejandra, por orientarme con su conocimiento, su perspectiva y por su apoyo.

A la familia Seizar, por haber brindado incondicionalmente sus instalaciones, su colaboración y tantos buenos momentos.

A los compañeros del CEDIVE, ayudantes y pasantes, que formaron parte en distintas etapas de este trabajo, por su gran ayuda en el campo y en el laboratorio.

A aquellos que ofrecieron amablemente su valiosísima experiencia, materiales, asesoramiento, etc., y sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible, entre ellos:

Ricardo Sánchez, Sergio Martorelli, José Álvarez, Oscar Racioppi, Salcedo Eduardo, Margarita Ostrowski de Nuñez, Gastón Moré, Daniel Rondelaud, Gilles Dreyfuss, Pablo Cuervo, Oscar Anziani, Daniel Aguirre, Jacques Cabaret, Oscar Correa, Daniel Salada.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

1. Sanchez, R., Sanabria, R., Romero, J. 2005. Hallazgo de *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901) en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. Vet. Argent. 19: 290-292.
2. Sanabria R. 2007. "Paramphistomosis en los ovinos". En Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América Editores Suárez V. y otros: EEA INTA Anguil. Publicación técnica N° 70. ISSN0325-2132. Pag 169-177
3. Sanabria, R., Romero, J. 2008. Review and update of Paramphistomosis. Helminthologia. 45 (2): 64-68.
4. Sanabria, R., Martorelli, S., Romero, J. 2009. First report of *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 (Trematoda: Paramphistomidae) in Argentina, and re-examination of *Cotylophoron cotylophorum sensu* Racioppi et al. (1994) . Helminthologia. 46 (4): 225-229.
5. Sanabria, R., Moré, G., Romero, J. 2011. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). Vet. Parasitol. 177 (1-2): 182-185.

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1.	Clasificación taxonómica	1
1.2.	Hospedadores Intermediarios (HI)	4
1.3.	Hospedadores Definitivos (HD)	5
1.4.	Ciclo Vital	5
1.5.	Patología y Patogenia	10
1.6.	Epizootiología	12
1.7.	Diagnóstico de Laboratorio	15
1.8.	Control	16
1.9.	La Situación en América y Argentina	18

2. HIPOTESIS 21

3. TRABAJOS REALIZADOS

3.1.	Descripción de <i>Paramphistomum leydeni</i> en Argentina y redescrición de <i>C. cotylophorum</i> sensu Racciopi et al (1994).	
3.1.1.	Introducción	23
3.1.2.	Materiales y Métodos	23
3.1.3.	Resultados	24
3.1.4.	Discusión	27
3.2.	Identificación de <i>Paramphistomum leydeni</i> mediante caracterización del segmento ITS- 2 del rDNA.	
3.2.1.	Introducción	29
3.2.2.	Materiales y Métodos	29
3.2.3.	Resultados	31

3.2.4.	Discusión	32
3.3.	Hallazgos y distribución de paramphistomidos en Argentina: Modelos de nicho ecológico para el suborden Paramphistomata	
3.3.1.	Introducción	34
3.3.2.	Materiales y Métodos	34
3.3.3.	Resultados	37
3.3.4.	Discusión	38
3.4.	Hospedadores Intermediarios de <i>Paramphistomum leydeni</i> .	
3.4.1.	Introducción	43
3.4.2.	Materiales y Métodos	43
3.4.3.	Resultados	45
3.4.4.	Discusión	47
3.5.	Desarrollo de <i>Paramphistomum leydeni</i> en el hospedador definitivo.	
3.5.1.	Introducción	50
3.5.2.	Materiales y Métodos	50
3.5.3.	Resultados	51
3.5.4.	Discusión	52
3.6.	Relaciones entre adultos de <i>P. leydeni</i> y estadíos larvales hallados en los HI, mediante caracterización molecular de los segmentos ITS del rDNA.	
3.6.1.	Introducción	54
3.6.2.	Materiales y Métodos	54
3.6.3.	Resultados	56
3.6.4.	Discusión	58

3.7.	Tendencia y estacionalidad en la infestación por <i>Paramphistomum leydeni</i> en ovinos.	
3.7.1.	Introducción	61
3.7.2.	Materiales y Métodos	62
3.7.3.	Resultados	63
3.7.4.	Discusión	64
3.8.	Evaluación de Drogas frente a infestaciones por paramphistomidos: Eficacia de oxiclozanida al 10% en ovinos frente a <i>Paramphistomum leydeni</i> .	
3.8.1.	Introducción	66
3.8.2.	Materiales y Métodos	67
3.8.3.	Resultados	69
3.8.4.	Discusión	70
4.	CONCLUSIONES	72
5.	BIBLIOGRAFIA	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medidas en valores máximo y mínimo (mm) de <i>P.leydeni</i> de Corrientes y Buenos Aires, y comparación con las descripciones previas de <i>C.cotylophorum</i> (Racioppi et al., 1994) y la revisión de Eduardo (1982b).	26
Tabla 2. Características y origen de las muestras procesadas por PCR-RFLP.	33
Tabla 3. Resultados de RFLP para cada enzima, mostrando el tamaño aproximado (en bp), y número de fragmentos.	33
Tabla 4. Características de los hallazgos de Paramphistomidos en la Argentina.	41
Tabla 5. Variables bioclimáticas provistas en WORLDCLIM empleadas en el modelo.	42
Tabla 6. Resultados de exposición de diferentes gasterópodos a miracidios de <i>Paramphistomum leydeni</i> .	47
Tabla 7. Conteo de parásitos en necropsias.	70
Tabla 8. Reducción de huevos en material fecal en el grupo 2.	70

APENDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplares de *Paramphistomum* sp. A
- Figura 2.** Ejemplar de *Balanorchis anastrophus*. A
- Figura 3.** Cercarias Amphistomas. B
- Figura 4.** Dos ejemplares de *P. leydeni*, recolectados recientemente del rumen, uno de ellos elongado para adherir la ventosa oral. B
- Figura 5.** Huevos de *F. hepatica*, y *Paramphistomum* sp. C
- Figura 6.** Ejemplares de *P. leydeni* recuperados de intestino delgado y adulto de rumen. C
- Figura 7.** *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. D
- Figura 8.** *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Buenos Aires. E
- Figura 9.** *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. F
Sección sagital del acetabulo.
- Figura 10.** *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. F
Faringe y Esófago, sección sagital.
- Figura 11.** *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. G
Terminal genitalium, sección sagital.
- Figura 12.** Patrones de restricción del ITS-2+ de *P. leydeni* mediante la enzima *HhaI*. H
- Figura 13.** Patrones de restricción del ITS-2+ de *P. leydeni* mediante la enzima *Hinfl*. I
- Figura 14.** Secuencia concenso de *P. leydeni* ITS-2, y segmentos J
linderos 5.8S rDNA y 28S rDNA .

- Figura 15.** Distribución probable de los paramphistomidos de rumiantes mediante el modelado por BIOCLIM. K
- Figura 16.** Distribución probable de los paramphistomidos de rumiantes mediante el modelado por DOMAIN. L
- Figura 17.** Variables climáticas limitantes detectadas para el desarrollo de los paramphistómidos, mediante el modelo BIOCLIM. M
- Figura 18.** Variables climáticas limitantes detectadas para el desarrollo de los paramphistómidos, mediante el modelo DOMAIN. N
- Figura 19.** Fotografía satelital del arroyo Clé y espejos de agua en potreros lindantes al mismo, de donde se recolectaron los caracoles (Imagen de Google Earth ®). O
- Figura 20.** Cercarias de *Paramphistomum*, Notocotylidae y Furcocercarias halladas en *D. depressissimum*. P
- Figura 21.** Cercarias de *Paramphistomum* y *F. hepatica* halladas en *L. viatrix* y echinocercarias en *B. peregrina*. P
- Figura 22.** Eclosión de huevos de *P. leydeni* a 25°C. Q
- Figura 23.** Ejemplares de *Paramphistomum leydeni* de ovinos infectados experimentalmente. Q
- Figura 24.** Patrones de restricción del ITS-2+ de distintos estadios de *P. leydeni* mediante la enzima *HhaI*. R
- Figura 25.** Patrones de restricción del ITS-2+ de distintos estadios de *P. leydeni* mediante la enzima *HinfI*. S
- Figura 26.** Patrones de restricción del ITS-1+ de los HI de *P. leydeni* mediante la enzima *HpyF3I*. T

- Figura 27.** Secuencia consenso del ITS1 de *L. viatrix* cepa U. (*L. viatrix ventricosa*). U
- Figura 28.** Secuencia consenso del ITS1 de *L. viatrix* cepa SP (*L. neotropica*). V
- Figura 29.** Distribución de temperaturas, precipitaciones y exceso hídrico en el suelo para los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. W
- Figura 30.** Regresión (modelo de poder) de la variable precipitaciones (independiente) sobre la prevalencia mensual y las medias aritméticas de los HPG. X
- Figura 31.** Tendencia anual de la primoinfestación en corderas para los años 2005, 2006 y 2007, expresada en media geométrica de los HPG. Y

Abreviaturas y símbolos.

bp: pares de bases

°C: grados centígrados

cm: centímetros

DEC: circular dorsal externa (unidades musculares)

DIC: circular dorsal interna (unidades musculares)

d.s.: desvío estándar

Grs: gramos

HD: hospedador definitivo

HI: hospedador Intermediario

HPG: huevos por gramo

HSD: diferencia honestamente significativa

ID: intestino delgado

ml: mililitros

mtc: metacercarias

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Pptac.: precipitaciones

Prom: promedio

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

µm: microlitros.

µm: micras o micrometros

1. INTRODUCCION

Se conoce genéricamente como Paramphistomosis a la parasitosis producida en rumiantes por trematodes pertenecientes, en su mayoría, a la familia Paramphistomidae, pudiendo hallarse otras familias involucradas (Gastrothylacidae y Balanorchiidae) de acuerdo a la distribución geográfica. Como en los demás digeneos, el ciclo vital requiere de un molusco gasterópodo como hospedador intermediario. Estos parásitos, en sus estadios inmaduros se ubican en el intestino delgado proximal y migran en forma anterógrada, alcanzando finalmente el rumen, donde permanecen como adultos. Morfológicamente se los distingue por su cuerpo piriforme, color rosado cuando están vivos, poseen una ventosa oral y una ventosa prominente en posición terminal o ventroterminal denominada acetábulo, mediante la cual se fijan a la mucosa. Una ventosa o poro genital de desarrollo variable según el género se presenta en la superficie cóncava del cuerpo (Fig. 1).

1. 1. Clasificación taxonómica

Según Sey (1991), los géneros más importantes en referencia a la Paramphistomosis de los rumiantes serían:

Metazoa

Phylum Platyhelminthes

Clase Trematoda

Subclase Digenea

Orden Echinostomida

Suborden Paramphistomata

Superfamilia Cladorchioidea

Familia Balanorchidae

Género/ especie *Balanorchis anastrophus*

Superfamilia Paramphistomoidea

Familia Gastrothylacidae

Género *Carmyerius*

Fischoederius

Gastrothylax

Velazquezotrema

Familia Paramphistomidae

Subfamilia Paramphistominae

Género *Calicophoron*

Cotylophoron

Explanatum

Gigantocotyle

Paramphistomum

Ugandocotyle

Como puede apreciarse, son varios los géneros involucrados, no obstante la dispersión mundial de éstos es bastante irregular (Over et al., 1992) y la complejidad de la sistemática morfológica de estas entidades induce a frecuentes errores en su clasificación. A pesar de los sucesivos cambios de ordenamiento sistemático que presentan estas entidades, el nivel taxonómico de Familia es el que ha permanecido más estable. Sey (1991), propone una clasificación basada en la ponderación de criterios holomorfológicos para los amphistomas en general, enmarcando en ésta a los parásitos de mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios. En lo que respecta al interés veterinario, se puede resumir que dicha clasificación ordena a la Superfamilia Paramphistomoidea (Stiles and Goldberg, 1910) en varias familias, de las cuales las que involucran a parásitos de los rumiantes son Gastrothylacidae y Paramaphistomidae. La última contiene dos subfamilias: Orthocoeliinae y Paramphistominae, y a su vez esta última es continente de los géneros parásitos de rumiantes. Los miembros de la Familia Gastrothylacidae se hallan fundamentalmente en Asia y África, así como los géneros como *Ugandocotyle*, *Gigantocotyle* y en parte *Cotylophoron*, originados principalmente en el último continente mencionado. Paralelamente, se encuentra la superfamilia Cladorchoidea que contiene, entre otras, a la Familia Balanorchiidae (Ozaki 1937), cuyo único integrante es *Balanorchis anastrophus*, parásito de rumiantes de América del Sur. Este es fácilmente distinguible del resto de los paramphistomidos por poseer tres filas de papilas en la extremidad anterior y un anillo muscular ventral por donde protruye la bolsa del cirro, lo cual ha dado origen al nombre del género (Fig. 2).

El género *Paramphistomum* parece ser el de mayor dispersión mundial (Over et

al., 1992), no obstante, dada la complejidad de la sistemática es frecuente que se realicen determinaciones específicas equívocas e incluso genéricas, por cuanto los mapas de distribución, basados en reportes previos, no están exentos de potenciales errores. La biología molecular ofrece hoy una herramienta complementaria y robusta que permite resolver algunas de estas cuestiones.

1. 2. Hospedadores intermediarios:

Dada la diversidad de géneros parásitos y su distribución cosmopolita, son varios los hospedadores intermediarios que emplean, pero en general se encuentran representados en tres familias de Gastropoda: Planorbidae, Bulinidae y Lymnaeidae. A excepción de los Bulinidae, cuyo origen es fundamentalmente africano, y se halla asociado a paramphistomidos del mismo origen (Dinnik & Dinnik, 1954), las otras dos familias son cosmopolitas.

En lo que respecta al continente americano, son pocos los informes acerca de hospedadores intermediarios de Paramphistomidos. Se ha descrito en América del Norte la infestación de *Lymnaea palustris*, *L. cubensis* y *L. humilis* por paramphistomidos (Pino y Morales, 1982; Castro Trejo et al., 1990). Hacia el hemisferio sur, se menciona a *L. columella* como uno de los HI de paramphistomidos, junto a *Galba (Lymnaea) truncatula*, en Colombia (Lopez et al., 2008), y se han citado planorbidos como *Biomphalaria tenagophila* (Silva Santos et al., 1986) y *Drepanotrema kermatoides* (Müller et al., 1992) en Rio Grande Do Sul, Brasil. También en Uruguay se mencionó la presencia de cercarias tipo paramphistomidae en *Drepanotrema anatinum* (Paiva, 1994).

Respecto a la especificidad de los HI, parece estar más definida en algunos casos

que en otros. Por ejemplo, *G. truncatula* muestra “preferencia” por *C. daubneyi*, frente a *L. glabra*, cuando ambos se hallan presentes. Sin embargo ambos pueden resultar parasitados, observándose incluso mayor prevalencia en el segundo cuando se trató de explotaciones ovinas (Abrous et al., 1999). En otros, como *Paramphistomum cervi*, se han encontrado 18 especies de planorbidos relacionados a su transmisión (Sey, 1991).

1. 3. Hospedadores Definitivos

Los paramphistomidos pueden parasitar a los rumiantes domésticos y salvajes. Se ha citado su presencia en ciervos, bisontes, y otros rumiantes salvajes (Dvoriadkin et al., 1983; Herd and Hull, 1981; Prestwood et al., 1975), siendo más frecuentes, por ser animales de producción, en bovinos, ovinos y caprinos (Amato et al., 1982; Gupta et al., 1984; Rocha-Calvacante et al., 2000; Silvestre et al., 2000). Incluso, se describe su presencia en el pulmón de un conejo como migración aberrante tras una inoculación experimental con metacercarias de *Paramphistomum cervi* (Singla et al., 1998).

1. 4. Ciclo Vital

Desarrollo en el ambiente y en el Hospedador Intermediario

Los huevos de paramphistomidos son incoloros y su longitud varía entre 116-189 μm (*Paramphistomum cervi*) (Sey, 1991). Eclosionan en el agua luego de un período variable según el género, pero fundamentalmente depende de la temperatura, a saber: a 27° C y en condiciones de laboratorio, la mayor eclosión de huevos de *Ceylonocotyle streptocoelium* ocurrió a los 16 días de incubación, y

a los 12 días en *Paramphistomum ichikawai* (Durie, 1953). En tanto Varma (1961) obtuvo la eclosión de miracidios de *Cotylophoron cotylophorum* luego de 18 días, a partir de huevos incubados a 26 °C. Una vez emergido, el miracidio se desplaza hasta encontrar a su hospedador intermediario. Para ello, posee placas epidermales ciliadas que permiten su movimiento en el medio líquido y, a diferencia de otros como el de *Fasciola hepatica*, no posee órganos fotosensibles. Durie (1953), observó que el movimiento en el líquido es en línea recta, rotando en sentido horario, y ante la vecindad de caracoles se muestran estimulados, con rápidos movimientos circulares.

Aparentemente, la penetración no se produce a través de las partes expuestas de caracol, sino mediante la abertura pulmonar o la parte posterior de la cavidad del manto (Durie, 1953; Lengy, 1960). Luego de ingresar, pierde su cubierta ciliada y se convierte en esporocisto, el que contiene células germinales (Durie, 1956). Estudios referentes a *C. cotylophorum* mostraron que el esporocisto comienza a formarse desde las 24 hs posteriores a la penetración del miracidio y a los 4 días se observan redias pequeñas dentro del mismo. Luego, las células germinales darán origen a redias, las cuales se observaron a partir de los 6 días post infestación (Varma, 1961). Estas son cortas y no poseen apéndices ni collar nervioso (Horak, 1971; Sey, 1991). A partir de las redias puede originarse segundas generaciones de las mismas o bien cercarias. La producción de mas o menos generaciones rediales parece estar sujeta a variaciones ambientales y factores de estrés (Durie, 1953), así como también al parasitismo conjunto con otros digeneos, mediante mecanismos de facilitación (Augot et al., 1996), y también la alimentación (Rondelaud et al., 2002).

En cuanto a las cercarias, son pigmentadas y poseen 2 órganos fotorreceptores (manchas oculares) que estarían involucradas en captar estímulos luminosos que las inducen a abandonar el caracol (Varma, 1961), y al parecer a mayor intensidad lumínica es mayor la eliminación (Lengy, 1960).

En la naturaleza es posible encontrar caracoles de agua dulce parasitados por una amplia variedad de cercarias, algunas con manchas oculares, como las pertenecientes a la familia Notocotylidae (monostomas parásitos de aves) (Flores y Brugni, 2005), o bien cercarias de amphistomas, parásitos de otros vertebrados, como es el caso de *Zygocotyle lunata* (HD: aves) (Fried et al., 2009), o *Catadiscus uruguayensis* (HD: ranas y culebras) (Ostrowsky de Nuñez, 1979), y que pueden presentar algunas características similares a aquellas de los géneros parásitos de mamíferos superiores. Para su diferenciación, existe una clasificación (Sey, 1992), que las divide en tres grupos:

Cercaria dyplcotylea: sin pigmentación en el cuerpo y usualmente con apéndices faríngeos, normalmente parasitan a vertebrados inferiores.

Cercaria intermedia: presentan divertículos en los tubos excretores principales, con o sin pigmentación y con apéndices faríngeos (Ej. *Catadiscus uruguayensis*) (Fig. 3).

Cercaria pigmentata: presentan pigmento en el cuerpo y anastomosis medio lateral de los tubos excretores principales y no presentan apéndices faríngeos. En este grupo se encuentran las pertenecientes a la Familia Paramphistomidae, parásitos de rumiantes domésticos (Fig. 3).

En infestaciones experimentales por *C. cotylophorum*, la emergencia de cercarias se inició el día 26 post infestación (Varma, 1961), en tanto para *P. microbothrium*,

fue a partir del día 37 (Lengy, 1960).

Una vez liberada, las cercarias se desplazan en el agua mediante el movimiento de la cola hasta alcanzar la vegetación subacuática, donde se adhieren por su superficie ventral y comienza el proceso de enquistamiento, mediante la secreción de las glándulas cistógenas. Posteriormente, realiza movimientos de rotación, afinando la secreción liberada y formando dos capas: una opaca interna y una externa más clara. Por último, la cercaria se contrae y se libera de la cutícula, formando una tercera capa (la más interna) del quiste, dentro de la cual sigue rotando por varias horas. El proceso de enquistamiento se realiza normalmente dentro de los 30 minutos de liberada, mientras que una vez formada necesita de un período de maduración de al menos 24 hs (Horak, 1962b). En cuanto a la viabilidad, un 32% de cercarias de *P.ichikawai* permanecieron viables luego de 6 meses en condiciones de humedad (Durie, 1953), en tanto Srivastava (1938), comprobó una viabilidad de hasta 4 meses para metacercarias de *C. cotylophorum*.

Desarrollo en el Hospedador Definitivo

Una vez que las metacercarias son ingeridas por los rumiantes, alcanzan el estómago y luego el intestino delgado. Numerosos factores parecen estar involucrados en el desenquistamiento. Horak (1962b), observó, en forma experimental, que los factores determinantes fueron la presencia de ácido clorhídrico, tripsina y sales biliares, en tanto la pepsina y la ausencia de fluido ruminal no incidieron en el proceso. Una vez en el intestino los parásitos entran en un período de maduración variable que, según experimentos realizados por Horak

(1967), lo cual depende de la tasa de infestación, especie y género parasitario, especie del HD e inmunidad o contacto previo. Comparando la infestación en bovinos, ovinos y caprinos, y dosis de 5000 a 10000 metacercarias de *P.microbothrium*, la tasa de infestación inicial es superior en caprinos y ovinos hasta el día 20 post-infestación, respecto a los bovinos. Esta tendencia se revierte desde los días 97 y hasta los 487 días post-infestación, donde prácticamente solo se hallan ejemplares en los bovinos.

Una vez en el intestino delgado, la mayoría de los parásitos se ubican en los primeros 3 metros de intestino delgado (Arru et al., 1970; Horak, 1971). Aquellos ejemplares desarrollados en bovinos son siempre mayores a aquellos encontrados en caprinos y ovinos. El mayor tamaño y la “precocidad” en el desarrollo, dependiente del HD afectado, parece tener relación directa con el inicio de la migración desde el intestino hacia el rumen. De esta forma, la migración anterógrada comienza alrededor del día 20 en bovinos, y en forma similar en ovinos, no obstante en caprinos tal fenómeno ocurre recién desde el día 34-35. Esto también parece incidir en el período prepatente, siendo el mínimo hallado para *P.microbothrium* de 56 días en bovinos, 69 días en cabras y 93 en ovinos (Horak, 1967; Horak, 1971). Durie (1953, 1956), mencionó un período prepatente de 48 días en ovinos y 56 en bovinos infestados con *C. streptocoelium*, y más de 3 meses en corderos infestados con *C. calicophorum*. Krull (1934), citó una prepatencia de casi 4 meses en terneros infestados por *C. cotylophorum*.

Comparativamente, la relación hospedador-parásito parece más favorable en el caso de los bovinos que en los ovinos y caprinos (Horak, 1967).

1. 5. Patología y Patogenia

Los movimientos migratorios, desde el intestino hacia el rumen, son realizados mediante el desprendimiento del acetábulo, elongación del cuerpo y adherencia de la ventosa oral, luego de lo cual vuelve a adherirse el acetábulo y se suelta la ventosa oral para iniciar otro ciclo de avance (Fig. 4). Cuando este movimiento es producido por cientos o miles de individuos, la sucesiva adherencia y desprendimiento de las ventosas ocasionan microlesiones del tamaño del diámetro acetabular y erosiones del epitelio intestinal, el cual queda desnudo en esos puntos. En consecuencia, queda expuesta la lámina propia que pierde la capacidad secretoria y absortiva, de suma importancia sobre todo a nivel duodenal, tramo intestinal que resulta más afectado. Si se tiene en cuenta que la migración se inicia cuando el acetábulo alcanza unos 0,5 mm de diámetro (Horak, 1967), se debería multiplicar esta sección por la carga parasitaria, y a su vez por la cantidad de movimientos de desplazamiento, para tener una idea de la superficie dañada.

En un caso clínico presentado en bovinos se asoció la presencia de enfermedad con una carga de 50-60 parásitos inmaduros por pulgada cuadrada de intestino delgado (Boray, 1959). A nivel microscópico se han observado ejemplares inmaduros introducidos en diferentes niveles de la pared intestinal, hemorragias focales, separación de la túnica muscular y la submucosa, formando grandes espacios (edema), congestión vascular y necrosis de la mucosa y agrandamiento de las glándulas de Lieberküm y Brunner (Singh et al., 1971). Como consecuencia sobreviene diarrea por falta de absorción y pérdida de proteínas, ya que los vasos

de la lámina propia se encuentran casi en contacto directo con la luz intestinal. El barrido de los enterocitos ocasiona falta de absorción de nutrientes, lo cual agrava el cuadro. El edema mural en el duodeno puede generar oclusión del colédoco y producir coléctasis (Horak, 1967). En los casos clínicos documentados, los parámetros bioquímicos acusan reducción de las proteínas plasmáticas y del calcio ligado a albúminas, caída de la volemia, aumento del hematocrito, y de los índices hematimétricos, eosinofilia y leucopenia. La anemia es rara. A causa de la hipoproteinemia se producen edemas generalizados, y la mayoría de los animales que mueren presentan edema pulmonar (Boray, 1959).

No se ha asociado perjuicio aún con altas cargas de parásitos adultos en el rumen (Horak, 1971; Rimbaud y Lorenzo, 1995), si bien altas cargas de metacercarias en las pasturas contribuyen a la aparición de brotes (Boray, 1959; Horak, 1971). Rolfe et al. (1994), hallaron que cargas de 20-25.000 ejemplares inmaduros de *P. ichikawai* se relacionan directamente con la aparición de cuadros clínicos. No obstante, en Nueva Zelanda, se hallaron muertes en ovinos a campo por paramphistomosis, que alojaban 2.000 parásitos inmaduros (Boray, 1959). En otro experimento, la administración de 5.000 metacercarias de *C. cotylophorum* en un cordero produjo signos clínicos luego del día 116 post infestación (PI) y su muerte el día 124. Otro animal infectado inicialmente con 3.000 metacercarias fue sacrificado el día 112 PI, recuperándose solo formas inmaduras en rumen y retículo, mientras que exhibía lesiones de inflamación y gelatinización en el píloro y el duodeno (Varma, 1961). Rolfe et al. (1994), infectaron 30 corderos Merino de 7 meses con dosis altas (40.000 metacercarias) y bajas (5.000 metacercarias) de

P. ichikawai. En este estudio los animales se sacrificaron a los 21- 42 y 84 días PI. Los que recibieron dosis altas, el día 84 PI mostraron extensas lesiones intestinales, y lesiones en rumen. Los corderos que recibieron dosis baja mostraron lesiones menores, aunque el afinamiento de la pared intestinal era evidente. En los 2 grupos al día 84 todos los parásitos habían migrado al rumen.

Los animales expuestos a infestaciones previas, generan una sólida respuesta inmune que en general evita reinfecciones graves, por ejemplo, la administración de 40.000 metacercarias de *P. microbothrium* generó inmunidad en ovejas adultas que evitaron la muerte cuando se las desafió posteriormente con dosis superiores a 150.000 (Horak, 1965).

1. 6. Epizootiología

La aparición de casos clínicos en diferentes países tiene algunos puntos comunes. De acuerdo a Boray (1959), los casos de amphistomosis intestinal tuvieron lugar mayormente luego de lluvias abundantes, dado que esto facilita la eclosión de los huevos y el desarrollo de los caracoles en el ambiente. Con temperatura y humedad apropiadas, el ciclo se realiza en un período corto, los caracoles se dispersan con mayor facilidad y se halla menor cantidad de metacercarias por unidad de superficie. Con abundancia de vegetación, los animales sólo se acercan a áreas húmedas cuando necesitan beber. Así, se producen cuadros leves y asintomáticos y en muchos casos generando una “inmunización” en los animales expuestos. En cambio, en temporadas secas, el pasto verde se va concentrando y crece solo en parches, cercano a espejos de agua, rodeando las bebidas y zonas

más anegadizas. Si la proporción de caracoles infestados que proviene de la estación húmeda es alta, se concentran en sectores de menor superficie y la probabilidad de ingestión de metacercarias puede multiplicarse. Así, Boray, (1959), explica la aparición de brotes en estación seca, aunque Rolfe et al. (1991), observaron opuestamente que terneros trazadores adquirirían la parasitosis luego del pastoreo de áreas inundadas, lo cual puede obedecer a una falta de inmunidad de los mismos, en contraste con la resistencia que posee el rodeo residente. En el mismo trabajo, se halló que cargas de 2000 parásitos, acumuladas durante 8 semanas de pastoreo, tuvieron repercusiones en la salud de los animales, y esto se correlacionó con tasas de infestación en el HI (*Gyraulus scottianus*), superiores al 30%.

Gupta et al. (1985), realizaron un seguimiento en Haryana, India, durante seis años, que involucró el muestreo en heces de casi 30.000 ovinos y caprinos, así como el examen de preestómagos e intestinos en frigoríficos buscando adultos e inmaduros y el registro de casos clínicos de paramphistomosis, contrastado con los factores climáticos ocurridos en ese período. Observaron claramente una mayor incidencia de adultos en rumen y huevos en materia fecal durante mayo a septiembre (fines de primavera a principios de otoño), mientras que una mayor presencia de inmaduros fue encontrada de septiembre a abril (otoño, invierno), período que coincidió además con mayor aparición de casos clínicos, llegando al 60% de mortandad en algunos rebaños. Cabe destacar que, en esta región se hallan presentes 6 géneros diferentes de paramphistomidos y al menos 8 especies de caracoles hospedadores. Otros estudios, al norte del mismo país, coincidieron

parcialmente en que el pico de eliminación de huevos se produce en primavera-verano (Hanna et al., 1988), en tanto en Pakistán también se observó una mayor presencia de adultos en otoño, luego de la estación lluviosa (Khan, 2008) .

Por todo lo expuesto, se deduce que para la ocurrencia de paramphistomosis debe coincidir una serie de condiciones, entre las más importantes, la temperatura y humedad adecuadas.

Sin duda, variaciones en el HI tienen también incidencia directa en el desarrollo del ciclo vital. Por ejemplo, algunas especies del género *Biomphalaria* pueden desarrollarse en un amplio rango de condiciones, prueba de lo cual es su mayor distribución en la Cuenca del Plata, si se compara, por ejemplo con la distribución mas limitada de los lymnaeidos (Gutiérrez Gregoric et al., 2006). Esto tiene que ver en parte con la adaptación o “contacto” que ha tenido el parásito a uno o más HI en una región determinada y el tiempo que lleva presente naturalmente, lo cual redundaría en una interacción de mayor o menor fuerza entre ambos y posteriormente, en el establecimiento de regiones endémicas. Como ejemplo de esto, infestaciones comparativas en *L. natalensis* y *G. truncatula*, frente a *F. gigantea*, favorecieron el desarrollo del parásito en el primero, (el cual es HI natural de *F. gigantea* en Egipto), versus el segundo, cuya distribución es europea (Dar et al., 2004). Factores como asociación o antagonismo entre distintas especies del HI, o interacciones entre digeneos también pueden modificar la tasa de infestación natural y posteriormente la epizootiología en una región (Abrous et al., 1999; Mage et al., 2002).

1. 7. Diagnóstico de Laboratorio

La técnica de sedimentación de Happich y Boray (1969), empleada para diagnóstico de *F. hepatica*, es también útil para la identificación de huevos de paramphistomidos en materia fecal. Ueno y Gonçalves (1988), realizaron algunas modificaciones en el proceso de filtrado. Básicamente consiste en la sedimentación de la materia fecal precedida por filtraciones por tamices de 250, 125 y 50 μm , lo cual mejora la visibilidad del material a observar. Los huevos son similares a los de *F. hepatica*, pero incoloros. Es conveniente evitar el uso de lugol, ya que tiñe los huevos de *F. hepatica* y *Paramphistomum* sp. de color marrón y dificulta la diferenciación, por lo cual se prefiere el empleo de azul de metileno, dado que no tiñe los huevos y solo colorea el material de fondo (Fig. 5). Esta técnica puede ser de escasa utilidad en casos agudos de paramphistomosis, ya que debido a la migración de formas inmaduras, en muchas oportunidades no hay aumentos en la oviposición o bien no se hallan huevos. Cuando esto sucede solo pueden identificarse ejemplares inmaduros en las heces diarreicas o lesiones en intestino, buscando la presencia de ejemplares de menos de 3 mm. Para la identificación en material de necropsia se realiza el raspado de la mucosa mediante enterótomo e identificación y conteo de los parásitos (Fig. 6). Para el diagnóstico diferencial deben tenerse en cuenta otras posibles causas de diarrea, dependiendo de las categorías afectadas y otros datos epizootiologicos, entre ellas, presencia de plantas toxicas a nivel gastrointestinal (Ej., *Bacharis coridifolia*), enterotoxemia en corderos, gastroenteritis verminosa, paratuberculosis y otras causas de diarrea, edemas y pérdida de peso.

1. 8. Control

En este caso la terapéutica farmacológica disponible es realmente escasa (Rolfe et al., 1987a, b), por lo cual el manejo es una de las herramientas más importantes. Entre las medidas posibles de implementar se puede mencionar a la rotación de potreros o ingreso con categorías de baja susceptibilidad como ovinos y bovinos adultos. Vale recordar, no obstante, que principalmente los bovinos y los ovinos adultos pueden actuar como una “reserva” de paramphistómidos en el rumen, pudiendo diseminar huevos del trematode a través de su materia fecal durante varios años (Horak, 1971) y favoreciendo de esta manera, la continua infección de los potreros. Otras prácticas complementarias de control serían el uso de molusquicidas, drenaje de potreros, alambrado de aguadas, etc., sin embargo, en la realidad no son muy utilizadas debido a su costo, dificultad de implementación o al impacto ambiental (contaminación).

Como se mencionara, además de la poca información disponible sobre la eficacia de fármacos, debe tenerse en cuenta que su actividad frente a los distintos estadios evolutivos es variable. Así, drogas con acción sobre inmaduros, muchas veces tienen escaso o nulo efecto frente a adultos y viceversa.

Horak (1962a, 1965, 1972) ensayó la eficacia de Bithionol, Lintex, Rafoxanide y Freon, resultando el primer fármaco el único con efectividad simultánea frente a estadios inmaduros (92.7-100%) y adultos (100%) (con dosis de 25 a 100 mg/Kg). El problema con algunas de estas drogas surge de su potencial toxicidad (Horak, 1965) y en ocasiones, de su disponibilidad.

Resultados más actualizados provienen de experiencias llevadas a cabo por Rolfe y Boray (1987a, b) donde el Resorantel (a 65 mg/kg) y un compuesto

butilbenzotiazol terciario (a 25 mg/kg) con una identificación interna de Ciba Geigy: CGA 72630-i, resultaron los únicos paramphistomicidas eficaces frente a adultos (ambos 100%) y para juveniles (95% y 99,7% respectivamente). El Triclabendazole (a 10mg/Kg), que es eficaz en formas maduras e inmaduras de *F. hepatica*, resultó ineficaz frente a estadios migrantes de paramphistómidos en ovinos (50% de eficacia a una dosis 10 veces mayor).

Experiencias con Closantel, Clorsulon y lactonas macrocíclicas mostraron ineficacia de estos principios frente a amphistomas inmaduros en bovinos (Rolfe y Boray, 1993), de la misma manera que el Nitroxynil, Praziquantel y Fenbendazol en ovinos (Rolfe y Boray, 1987b).

Albendazol a 20mg/kg arrojó resultados variables dado que en un ensayo mostró 99% de eficacia en ID, mientras que en otro solo un 13% (Rolfe et. al. 1987b). La Niclosamida tuvo una eficacia del 94 al 99% frente a inmaduros en ovinos, con dosis de 50 a 100 mg/Kg (Rolfe y Boray, 1987a), mientras que para otros autores estos resultados fueron similares con dosis de 100 mg/Kg en ovinos, los resultados fueron variables en bovinos (Gevrey y Bourdoiseau, 1998).

La Oxiclozanida mostró ser altamente eficaz en bovinos frente a formas adultas (100% eficacia) e inmaduras (95% eficacia), siendo estos resultados más consistentes cuando se realizaron dos dosificaciones (Rolfe y Boray, 1987a) versus una sola dosis (Rolfe y Boray, 1987a, Paraud et al., 2008). Otro ensayo describe la eficacia para el Febantel a 100 mg/Kg en bovinos de 94% en intestino y 93% en rumen, pero no fue evaluado en lanas (Sey, 1989).

Debido a las características que deben reunir los fármacos para ser eficaces, y probablemente el pequeño campo de aplicación de formulaciones especiales para

esta parasitosis, es que es escasa la oferta de opciones terapéuticas adecuadas.

1. 9. La situación en América y Argentina

Desde Quebec, Canadá (Bouvry y Rau, 1984), hasta Buenos Aires (Sanabria y Romero, 2008), existen reportes de hallazgos de *Paramphistomum* en América, incluyendo Estados Unidos (Herd y Hull, 1981) y México (Castro Trejo et al., 1990), y existen reportes además en Colombia y Venezuela (Forlano et al., 1997; López et al., 2008; Pino y Morales, 1982).

Comparativamente, la mayor información, se ha generado en Brasil, existiendo documentaciones de numerosos hallazgos en diferentes HD (Costa et al., 1999; Rocha Calvaçante et al., 2000; Toneto et al., 2001), en tanto en Uruguay existen variedad de reportes e incluso documentación de casos clínicos (Paiva, 1984; Rimbaud y Diana, 1991).

Respecto a los hospedadores intermediarios, en el hemisferio norte y en algunos informes de países al norte de Sudamérica (Colombia y Venezuela), el desarrollo de paramphistomidos se ha vinculado principalmente a la presencia de lymnaeidos (Castro Trejo et al., 1990; Krull, 1934; Pino y Morales, 1982), y no se hace mención de los planórbidos, como transmisores en el ciclo. En este contexto, Castro Trejo et al., (1990), investigaron acerca de la susceptibilidad de diferentes especies de lymnaeidos presentes en México, encontrando tres especies como potenciales vectores y coincidentemente con lo observado por Pino y Morales, (1982), *Lymnaea cubensis* parece uno de los HI más susceptibles.

Haciendo referencia al hemisferio sur, solo se dispone de informes de Brasil y Uruguay. En el primero, se han identificado, dos planórbidos como vectores de

paramphistómidos de los rumiantes: *Biomphalaria tenagophila* (Silva Santos et al., 1986), y *Drepanotrema kermatoides* (Müller et al., 1992), en tanto en Uruguay se mencionó a *Drepanotrema anatinum* (Paiva, 1994).

Lamentablemente la mayoría de los informes (salvo aquellos en los que se han realizado infestaciones experimentales) no cuentan con detalle exhaustivo en la descripción de cercarias, lo cual es importante, ya que como se mencionó, pueden hallarse otros paramphistomidos de, por ejemplo reptiles, anfibios o aves, parasitando a los caracoles de agua dulce.

Otro punto controversial es el de las especies y géneros presentes: de acuerdo a Sey (1991), los bovinos y los cérvidos se han desarrollado inicialmente en Asia y luego se dispersaron hacia África y parte de Eurasia y Norte América, es decir que la adaptación de los paramphistómidos al hemisferio sur es más reciente. Los paramphistomidos de los mamíferos se trasladaron con ellos, dado que provienen fundamentalmente de Eurasia, posiblemente utilizando la misma vía terrestre de poblamiento que los mamíferos a los que nos referimos. Un ejemplo es la presencia de *Calicophoron (Paramphistomum) microbothrioides* en Europa y Norteamérica (Herd y Hull, 1981; Sey, 1974; Prestwood et al., 1975). Se supone que este u otros géneros penetraron a Sudamérica luego de la emergencia del istmo de Panamá, hace 3 millones de años. (Sey, 1991).

Esta distribución esta directamente relacionada con las especies presentes, y aunque los errores de identificación han dado lugar a clasificaciones equívocas, se puede decir que El género *Calicophoron* se halla mayormente en América del Norte (Sey, 1991), y probablemente el género *Paramphistomum* se encuentre en varios países de América (Castro Trejo et al., 1990; Sanabria et al., 2009). El

género *Cotylophoron* ha sido documentado numerosas veces (Pino y Morales, 1982; Forlano et al., 1997) aunque es posible que, dado que este género es africano en origen, no esté correctamente identificado, o bien se trate de hallazgos en ganado importado.

Respecto a la Argentina, el primer hallazgo de paramphistomidos en rumiantes data de principios del siglo XX (Lahille y Johan, 1917), en Goya, Corrientes, describiendo *Balanorchis anastrophus*. Posteriormente, Szidat y Ostrowski de Núñez (1962), vuelven a informarlo en la zona y, Schiffo y Lombardero (1974) responsabilizaron a este parásito de la mortandad en vacunos de San Miguel, Corrientes. Posteriormente, y también para la Región Mesopotámica, se sucedieron otros informes de la presencia de *Cotylophoron cotylophorum* en bovinos (Bulman et al., 2002; Racciopi et al., 1994; Rodríguez Armesto et al., 2002), y luego se menciona por primera vez en la provincia de Buenos Aires (Sánchez et al., 2005), en bovinos y ovinos.

Al inicio del presente trabajo solo se contaba con la información presentada en el párrafo anterior, sin mayores precisiones acerca del hospedador intermediario, ciclo vital, distribución e impacto en la salud animal. La creciente casuística registrada en la provincia de Buenos Aires, acompañada por sucesivas consultas de profesionales, algunos con vasta experiencia a campo, y la falta de información acerca de este parásito motivaron la realización de los trabajos que se detallan a continuación.

2. HIPOTESIS

Objetivo General

Definir el ciclo vital de los paramphistomidos de los rumiantes presentes en regiones templadas, a partir de cepas de las provincias de Buenos Aires o Entre Ríos, y el estudio de los factores que inciden en su aparición.

Hipótesis:

1. Los criterios morfológicos empleados anteriormente para determinar la clasificación de Paramphistomidos en los rumiantes fueron poco exhaustivos e insuficientes para la correcta identificación específica del grupo.

Objetivo: caracterización de los paramphistomidos de rumiantes presentes en diferentes regiones del país.

2. Entre los gasterópodos de agua dulce de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, se encuentran aquellos que son capaces de actuar como hospedadores de paramphistomidos de los rumiantes.

Objetivo: Identificar el/los caracol/es que actúa/n como hospedador/es intermediario/s.

3. El reconocimiento de los verdaderos Hospedadores Intermediarios en nuestro país indicará su distribución como área potencial para el establecimiento de este parásito.

Objetivo: Caracterizar los estadios larvarios del trematodo en el caracol.

Describir los hallazgos en base a la casuística compilada.

4. Las variaciones anuales en la distribución poblacional del caracol (HI) modifican directamente el patrón de infección de los animales, la presentación de casuística y los riesgos de ampliación de su distribución geográfica.

Objetivo: Investigar variables e identificar los factores de incidencia directa en el desarrollo del ciclo.

5. El parásito es de escasa patogenicidad, no obstante la ingesta de gran número de metacercarias puede producir merms en la ganancia de peso, desarrollo de los corderos e incluso producir enfermedad clínica.

Objetivo: Realizar infección experimental en rumiantes, tomando al ovino como modelo.

Estimar la patogenicidad en términos de lesiones producidas.

Ensayo de eficacia de drogas disponibles.

3. TRABAJOS REALIZADOS

3. 1. Descripción de *Paramphistomum leydeni* en Argentina y redescrición de *C. cotylophorum* sensu Racciopi et al. (1994)

3.1.1. Introducción

Los dos paramphistomidos de los rumiantes mencionados al momento en la bibliografía local son *Balanorchis anatrophus* (*Verdunia tricornata* sensu Lahille y Johan, 1917) y *Cotylophoron cotylophorum* (sensu Racciopi, 1994). El primero de ellos no presenta dudas, en cuanto a su clasificación, debido a sus características morfológicas unívocas, y al ser la única especie que representa al género. Por el contrario, los reportes posteriores de *C. cotylophorum* (Bulman et al., 2002; Rodríguez Armesto et al., 2002; Sánchez et al., 2005), se basaron en la descripción previa, sin incluir detalles morfológicos de los hallazgos. Una descripción exhaustiva del género *Cotylophoron* (Eduardo, 1985), así como otros reportes detallados de paramphistomidos de países vecinos, como Uruguay y Brasil (González Medina, 1975; Freyre, 1987; Costa et al., 1999), llevaron a pensar que los ejemplares identificados como *C. cotylophorum* podrían pertenecer a otra u otras especies. Para corroborarlo, se examinaron ejemplares identificados previamente como *C. cotylophorum*, provistos por los autores de la primer clasificación (Racciopi et al., 1994), y a su vez se compararon con otros ejemplares procedentes de la provincia de Buenos Aires.

3.1.2. Materiales y Métodos

Se examinaron ocho ejemplares de *C. cotylophorum* fijados en formol y

colectados por Racioppi et al. (1994), en bovinos de un frigorífico localizado en San Cayetano, Corrientes (27°25'S, 58°39'W). Éstos se compararon con trece amphistomas obtenidos tras la necropsia de un ternero proveniente de Zárate, (Buenos Aires) (34°05'S, 59°05'W). Estos últimos ejemplares fueron colocados en solución salina y posteriormente transferidos a formol (10 %), para su preservación. Cinco ejemplares de Corrientes y diez de Buenos Aires fueron teñidos con Carmín clorhídrico, deshidratados en trenes de etanol de graduación creciente, aclarados en clove oil (aceite de clavo de olor) y montados en bálsamo de Canadá. Tres especímenes de cada origen se fijaron con etanol 70 %, luego deshidratados, incluidos en parafina y cortados con micrótopo en secciones de 4 – 5 µm de espesor, siguiendo técnicas histológicas estándar. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina – eosina, en búsqueda de estructuras musculares de importancia para la clasificación taxonómica (acetábulo, faringe y genitalia), mediante la nomenclatura propuesta por Eduardo (1982a).

Se tomaron medidas en milímetros de los especímenes montados en bálsamo y de las secciones histológicas (Tabla 1), y se depositaron vouchers de los ejemplares examinados en la colección Helmintológica del Museo de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata (MLP).

3.1.3. Resultados

Descripción

Paramphistomum leydeni Näsmark, 1937

Syn. *Cotylophoron cotylophorum* (sensu Racioppi et al., 1994) (Figs. 7– 11).

Localidad: San Cayetano, Corrientes (27°25'S, 58°39'W), y Zárate, Buenos

Aires (34°05'S, 59°05'W), Argentina.

Hospedador: *Bos taurus* Linnaeus, 1758.

Sitio de infección: rumen

Vouchers depositados: MLP N° 5725 y 5726.

La descripción se basa en 8 especímenes de Corrientes (5 montados y cortes histológicos de otros 3) y 13 especímenes de Buenos Aires (10 montados y 3 en cortes histológicos). Las medidas de ambos se muestran en la tabla 1.

Descripción: Cuerpo cónico, rosado en estado fresco. Pequeñas papilas tegumentarias presentes en el primer tercio de la superficie corporal, llegando hasta el poro genital. Acetábulo subterminal, tipo *Paramphistomum* caracterizado por una doble fila de unidades musculares dorsales externas: D.E.C. 1, y D.E.C. 2, las primeras mayores en tamaño y con menor número de fibras que las segundas.

Faringe de tipo *Liorchis* (sensu Näsmark 1937), con superficie interna cubierta por papilas y sin bulbos o esfínter posterior. Ciegos prácticamente rectos a lo largo de los laterales del cuerpo, llegando a la altura del acetábulo, sin intersección media.

Testículos en tándem, ligeramente lobulados. Vesícula seminal larga, pars muscular y pars prostática presentes. Ovario post-testicular. Glándula de Mehlis cercana al ovario. Canal de Laurer presente. Vitelario distribuido lateralmente desde la mitad de la faringe hasta la mitad anterior del acetábulo. El poro genital se abre a nivel de la bifurcación cecal. Terminal genitalium de tipo *Leydeni* (sensu Eduardo 1982a) en sección sagital.

Tabla 1. Medidas en valores máximo y mínimo (mm) de *P. leydeni* de Corrientes y Buenos Aires, y comparación con las descripciones previas de *C. cotylophorum* (Racioppi et al., 1994) y la revisión de Eduardo (1982b).

	Corrientes		Buenos Aires		<i>Cotylophoron cotylophorum</i>	<i>Paramphistomum leydeni</i>
	SHM (n=3)	TyC(n=5)	SHM (n=3)	TyC (n=10)	Racioppi et al., 1994	Eduardo, 1982b
Largo	5.88-6.42	7.36-10.86	6.20-8.36	7.34-9.94	7-13	4.1-6.8
Ancho	3-3.12	3.67-4.48	2.02-2.61	2.83-4.52		2-3.35
Diam.	1.38-1.69	1.60-2.16	1.50-1.70	1.66-2.55	1.6-2.1	1.28-1.81
Acetábulo						
Largo Faringe	0.7-0.86	0.75-1.02	0.64-0.84	0.66-0.96	0.7-0.85	0.57-0.84
Ancho Faringe	0.44-0.55	0.67-0.94	0.57-0.61	0.65-1.00		0.51-0.58
Esófago	0.47-0.57	0.49-0.75	0.57-0.81	0.49-1.20		0.51-0.78
Largo TA	1.04-1.39	1.13-1.96	0.98-1.20	0.89-2.00		0.53-0.97
Ancho TA	1.3-1.35	1.76-2.19	1.00-1.36	1.10-2.66		1.01-1.54
Largo TP	0.6-0.7	0.98-1.86	0.80-0.91	0.78-1.63		0.53-0.93
Ancho TP	1.66-2	2.32-3.48	1.50-1.75	1.81-3.15		0.83-1.96
Pars prostática	0.20-0.26	0.24-0.44	0.28-0.40	0.20-0.44		0.19-0.32
Diámetro Ovario	0.58-0.69	0.61-0.94	0.45-0.61	0.61-1.00	0.5-0.62	0.28-0.55
Relación Acetábulo-largo total	1:3.8-4.3	1:3.5-5.7	1:4.1-4.9	1:2.9-5.3		1:3-3.7
Relación Faringe Largo total	1:7.5-8.4	1: 8.5-12.8	1:9.7-11.2	1:8.8-11.3		1:6-8.6
Relación Faringe-Acetábulo	1:1.9	1:1.8-2.7	1:2-2.5	1:1.9-3.9		1:1.9-2.5
Fibras Musculares						
D.E.C.1	10-15		12-14			10-14
D.E.C.2	27-33		26-30			34-39
D.I.C.	38-41		36-44			38-44
V.E.C.	13-15		11-15			16-20
V.I.C.	48-53		42-55			47-50
M.E.C.	13-16		16-23			14-26

Referencias: SHM: secciones histológicas medias; TyC: ejemplares teñidos y comprimidos; TA: testículo anterior; TP: testículo posterior; DEC: fibras dorsales externas circulares; VEC: fibras ventrales externas circulares; DIC: fibras dorsales internas circulares; VIC: fibras ventrales internas circulares; MEC: fibras medias externas circulares.

3.1.4. Discusión

Los amphistomas previamente clasificados como *C. cotylophorum* por Racioppi et al. (1994), no mostraron similitud con las características propias del género (Eduardo, 1985; Sey, 1991), destacando la ausencia de una verdadera ventosa genital (en *C. cotylophorum*, esta estructura tiene prácticamente el mismo tamaño que la faringe).

La presencia en los ejemplares de acetábulo tipo *Paramphistomum* y faringe tipo *Liorchis* permiten ubicarlos fácilmente en el género *Paramphistomum*. En el último, y atendiendo a la estructura de la genitalia (tipo *Leydeni*), las medidas, las relaciones entre el cuerpo y demás estructuras, y las características de los paquetes musculares de la faringe y acetábulo, los amphistomas previamente descritos por Racioppi et al. (1994) se reclasificaron como *Paramphistomum leydeni*.

Tanto los amphistomas de Corrientes como los provenientes de Buenos Aires fueron coincidentes con las descripciones realizadas para *P. leydeni* (Näsmark 1937) por Eduardo (1982b), y otros documentos referidos a esta especie (Sey, 1991; Costa et al., 1999). En ambos casos, las medidas de los ejemplares montados y teñidos son mayores que aquellas tomadas en cortes histológicos, debido a que se incrementan cuando son aplastados para la observación de estructuras internas.

Los especímenes encontrados en bovinos de Buenos Aires, fueron muy similares a los de Corrientes, con solo algunas diferencias menores en el largo y ancho del cuerpo. Acorde a la anamnesis, el rodeo de Zárate (Buenos Aires) nunca había recibido animales desde corrientes o regiones vecinas, por lo cual es altamente probable que el ciclo se haya desarrollado dentro del mismo

establecimiento.

Un informe de Brasil describe la morfología en detalle de *Cotylophoron travassosi*, sobre un aislamiento en ganado cebuino, aunque no se informa acerca del origen de los vacunos (Costa y Guimaraes, 1992). En tanto, otros trabajos posteriores parecen corroborar la presencia del género en América (Alarcón y Velásquez, 2009; Miranda y Costa, 1999). Los hallazgos publicados no ofrecen evidencia sobre la presencia de este género en nuestro país, por lo cual es posible que la mayoría de las descripciones pertenecientes al género *Cotylophoron* publicadas en la Argentina pertenecieran a *Paramphistomum*. De todas formas, aún no puede descartarse la presencia de otros géneros o especies. Hasta el momento, *P. leydeni* sería la especie más ubicua.

3. 2. Identificación de *Paramphistomum leydeni* mediante caracterización del segmento ITS- 2 del rDNA.

3.2.1. Introducción

Dada la gran similitud entre especies dentro de la familia Paramphistomidae, y su compleja sistemática, las técnicas de biología molecular podrían aportar nuevos elementos de juicio para la diferenciación y caracterización de especies.

Algunos géneros han sido estudiados mediante técnicas moleculares: Itagaki et al. (2003) caracterizaron tres géneros diferentes mediante el espacio interno transcripto 2 (ITS-2) del DNA ribosómico (rDNA), mientras que Rinaldi et al. (2005) aplicaron técnicas similares usando el ITS-2 de *Calicophoron daubneyi* obtenidos de diferentes hospedadores definitivos (HD). El género *Paramphistomum* no cuenta con antecedentes de caracterización mediante esta metodología, por lo cual se obtuvo información en este sentido en el presente trabajo, mediante el marcador ITS-2 usando PCR-RFLP y secuenciación.

3.2.2. Materiales y Métodos

Ejemplares adultos de *P. leydeni* que fueron recolectados entre los años 2002–2009 fueron identificados teniendo en cuenta su HD (bovinos u ovinos), origen (Buenos Aires, Entre Ríos), fuente de infestación (natural o experimental) y método de preservación (congelado a -20°C , etanol 70°C o Formol 5%). Como controles, se emplearon cercarias Notocotylidae, así como huevos y adultos de *Fasciola hepatica* (Tabla 2). Para la extracción de ADN se emplearon: un

especimen adulto de *P. leydeni* de cada origen, adultos de *F. hepatica*, 10 cercarias Notocotylidae y aproximadamente 100 huevos de *F. hepatica*. Los ejemplares de *P. leydeni* fueron previamente identificados usando técnicas estándar (Sanabria et al., 2009). La extracción de DNA se realizó mediante el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El proceso de lisis mediante proteinasa K se realizó durante 12 hs. El segmento ITS-2 del DNAr más los fragmentos laterales parciales 5.8S y 28S se amplificó usando los primers ITS-2 F (5_TGTGTCGATGAAGAGCGCAG-3_) e ITS-2 R (5_TGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3_), tal como fue previamente descrito (Itagaki et al., 2003; Rinaldi et al., 2005), con pequeñas diferencias en la temperatura de annealing (55°C por 1min). Los productos de PCR fueron evidenciados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con SYBRsafe (Invitrogen), y observados en transiluminador azul (Safe Imager, Invitrogen). Se adicionó marcador de peso molecular de 100 bp (Biodynamics). Los amplificados se cortaron individualmente mediante las endonucleasas *Bsh1285I*, *HinfI*, *HhaI*, *RsaI*, *BsuRI*, *TaqI*, y *Tru1I* (Fermentas Life Science, EU), empleando los buffers recomendados por el fabricante. Para las reacciones se usaron 5µl de cada amplicon y 0.3 µl de enzima. La incubación fue hecha en baño seco, por 1 hora a 65°C para las enzimas *TaqI*, y *Tru1I*, mientras que fue de 1h a 37°C para las demás. Los productos de restricción se visualizaron en geles de agarosa al 2,5% y revelados como se describió previamente.

Cuatro muestras positivas de diferente procedencia geográfica, fueron amplificadas en volumen final de 50µl, utilizando el kit comercial QIAquick® PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), de acuerdo a las

recomendaciones del fabricante, y enviados al IGEVET (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata) para su secuenciación. Ésta se realizó en ambos sentidos mediante el secuenciador DYEnamic sequenciator (GE Healthcare). Los productos se analizaron con el software CHROMAS Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd.) y Clustal X 2.0.11 (<http://www.clustal.org>).

3.2.3. Resultados

Seis muestras de *P. leydeni*, así como las cercarias Notocotyliidae produjeron fragmentos de unos 500 bp para el ITS-2+, mientras los huevos de *F. hepatica* produjeron uno de 540 bp aproximadamente. Las muestras fijadas en formol resultaron negativas. Se obtuvieron además productos de restricción de las endonucleasas *Hinfl*, *Hhal*, *BsuRI*, *TaqI* y *Tru1I*. Comparativamente, *F. hepatica* dio fragmentos de restricción solamente con las enzimas *Hinfl*, *RsaI*, y *Tru1I*. Notocotyliidae fue cortado por las mismas enzimas que *P. leydeni* y por *RsaI* (Figs. 12 y 13). Todas las muestras de *P. leydeni* mostraron el mismo patrón de restricción. El peso molecular aproximado de los fragmentos para cada enzima se muestra en la tabla 3. Las secuencias analizadas fueron idénticas entre sí. Por último, fueron comparadas con otras disponibles usando la herramienta online BLAST (NCBI), y registradas en GenBank® bajo los números de acceso HM209064, HM209065, HM209066 y HM209067 para las muestras 4, 8, 9, y 10, respectivamente.

Considerando todas las secuencias en ambos sentidos, se obtuvo una secuencia consenso de 441 bp. Esta contiene el ITS-2 de 282 bp más los laterales parciales 5.8S rRNA (107 bp) y 28S rRNA (52 bp) (Fig. 14).

3.2.4. Discusión

Como se mencionó antes, la caracterización del segmento ITS-2 demostró ser una herramienta útil para la identificación de amphistomas y podría ser usado en varios digeneos, a fin de complementar la sistemática morfológica tradicional (Itagaki et al., 2003; Rinaldi et al., 2005; Goswami et al., 2009). Los amplificadores de *P. leydeni* no mostraron diferencias intraespecíficas al ser cortados por enzimas de restricción. La falta de variación entre muestras parece avalar la hipótesis previa acerca de que la misma especie (*P. leydeni*), parasita a ovinos y bovinos por igual, y que la misma se halla distribuída en diferentes regiones geográficas. Por otro lado, los huevos de *F. hepatica* y las cercarias Notocotylidae mostraron patrones de restricción diferentes.

Las secuencia consenso obtenida para *P. leydeni* mostró alta similitud (98%) con otros amphistomas como *Fischoederius cobboldi*. Sin embargo, ambos parásitos son taxonómica y morfológicamente distantes. (Sey, 1991). También se observó alta similitud (97%), con amphistomas de la misma familia, como *C. daubneyi* o *C. calicophoron*, no obstante, se observó un patrón de restricción diferente al hallado para estas especies (Rinaldi et al., 2005). Esto respalda la posibilidad de diferenciación de especies mediante RFLP.

Tabla 2. Características y procedencia de las muestras procesadas por PCR-RFLP.

Muestra	Especimen	Estadio	Hospedador	Fuente de infestación	Provincia	Localización Geográfica	Fecha de recolección	Preservación
1	<i>P. leydeni</i>	Adulto	Bovinos	N	ER	32.55 S 59.12 W	Jan-04	Formol
2	<i>P. leydeni</i>	Adulto	Bovinos	N	ER	30.38 S 58.75 W	Sep-06	Formol
3	<i>P. leydeni</i>	Adulto	Bovinos	N	BA	35.26 S 58.20 W	Sep-08	Formol
4	<i>P. leydeni</i> (*)	Adulto	Bovinos	N	BA	34.05 S 54.05 W	Jan-02	Etanol
5	<i>P. leydeni</i>	Adulto	Bovinos	N	BA	35.34 S 58.01 W	Jun-08	Formol
6	<i>P. leydeni</i>	Adulto	Bovinos	N	BA	35.34 S 58.01 W	Aug-09	Congelado
7	<i>P. leydeni</i>	Adulto	Bovinos	N	BA	35.34 S 58.01 W	Nov-08	Congelado
8	<i>P. leydeni</i> (*)	Adulto	Bovinos	N	BA	35.34 S 58.01 W	Nov-08	Etanol
9	<i>P. leydeni</i> (*)	Adulto	Ovinos	E	BA	35.34 S 58.01 W	Nov-09	Congelado
10	<i>P. leydeni</i> (*)	Adulto	Ovinos	N	ER	32.55 S 59.12 W	Dec-09	Congelado
<i>Drepanotrema</i>								
11	Notocotylidae	Cercarias	<i>sp.</i>	N	ER	32.55 S 59.12 W	Dec-09	Etanol
<i>F. hepatica</i>								
12	<i>F. hepatica</i>	Adulto	Bovinos	E	BA	35.34 S 58.01 W	May-08	Formol
13	<i>F. hepatica</i>	Huevos	Bovinos	E	BA	35.34 S 58.01 W	May-08	Congelado

Referencias: N: Natural; E: Experimental; ER: Entre Ríos; BA: Buenos Aires.

(*) Muestras secuencias y reportadas en GenBank.

Tabla 3. Resultados de RFLP para cada enzima, mostrando el tamaño aproximado (en bp), y número de fragmentos.

	Bsh1285I	Hinfl	HhaI	RsaI	BsuRI	TaqI	Tru1I
<i>P. leydeni</i>	-	130;170;200	220;280	-	100;400	40;460	60;150;290
Notocotylidae	-	200;300	190;310	100;150;250	100;400	40;190;270	120-380
<i>F. hepatica</i>	-	270;270	-	100;140;300	-	-	260-280

3. 3. Hallazgos y distribución de paramphistomidos en la Argentina: Modelos de Nicho Ecológico para el Suborden Paramphistomata

3.3.1. Introducción

Los primeros hallazgos de paramphistomidos de rumiantes en la Argentina datan de principios del siglo XX y se han ido incrementado particularmente en la última década en la provincia de Buenos Aires (Sánchez et al., 2005). Tales hallazgos generan la hipótesis de que la distribución de paramphistomidos probablemente alcance otras regiones, siempre y cuando la presencia del HI y los gradientes ambientales permitan el desarrollo de su ciclo de vida. En consecuencia, en el presente trabajo se analizó la distribución geográfica actual, en base a la información disponible hasta el presente.

3.3.2. Materiales y Métodos

Base de datos geográficos

La información fue recopilada a partir de hallazgos mencionados en publicaciones nacionales referidas al tema más datos procedentes del diagnóstico de laboratorio obtenidos en el CEDIVE y comunicaciones personales de otros laboratorios, que procesan muestras para el diagnóstico o investigación de helmintosis en rumiantes.

Los sitios fueron georreferenciados en coordenadas geográficas a partir de los datos publicados u obtenidos, a nivel de partido/departamento, utilizando el software Google Earth ®, o mediante GPS *in situ*. Se tuvieron además en cuenta el tipo de material (estadio) (adultos o bien huevos en materia fecal), y la especie del HD, los cuales se indican en la tabla 4. Para los hallazgos

mencionados en la literatura como *C. cotylophorum*, y que no fue posible corroborar su identidad en el presente trabajo, se sostuvo la denominación. Probablemente, en su mayoría correspondan al género *Paramphistomum* (Sanabria et al., 2009). Para los hallazgos en Corzuelas (*Mazama gouzoupira*), correspondiente a huevos en materia fecal, se hace referencia a Paramphistomata, taxón común a todos los paramphistomidos de rumiantes, pudiendo corresponder a los géneros y especies presentes en rumiantes domésticos (*Paramphistomum*, *Balanorchis*) o en otros taxones.

Descripción del modelo

Mediante el empleo de sistemas de información geográfica (GIS), se cotejaron los sitios de presencia y datos de variables ambientales. Se utilizaron dos modelos de nicho ecológico: BIOCLIM (Busby 1991) y DOMAIN (Carpenter et al., 1993), provistos por el software DIVA-GIS 7.1.7.2. Ambos modelos utilizan la base de datos climáticos WORLDCLIM (Hijmans et al., 2005) para identificar áreas favorables para la distribución de los organismos, basada en aspectos climáticos y ecológicos de los sitios de presencia confirmada. La base fue creada a partir de la interpolación de los registros de estaciones climáticas obtenidos entre 1950-2000.

Estos modelos de nicho utilizan dos tipos de información (datos primarios y secundarios) para predecir la distribución potencial de especies. Los datos primarios son los sitios de colecta u observación de la especie de interés, pudiéndose obtener a través de colectas propias, de bases de datos de colecciones científicas o publicaciones. Los datos secundarios son la información de clima, topografía y demás datos ambientales obtenidos de sensores remotos. BIOCLIM (Busby, 1991) emplea el algoritmo “Envelope”,

que utiliza un juego de datos secundarios de cada sitio para derivar un perfil de hábitat adecuado en base a los límites observados para cada condición secundaria. Predice las condiciones adecuadas (óptimo) para una especie entre los valores extremos de las variables climáticas, determinados por el conjunto de sitios conocidos. Los sitios donde los valores se encuentran dentro del percentil 5-95 del “envelope” climático son tradicionalmente clasificados como regiones “núcleo” de idoneidad. En diversos estudios se ha determinado que BIOCLIM tiende a sub-predecir la distribución potencial, con un error de omisión substancialmente mayor (Loiselle et al., 2003, Ward, 2007).

El modelo DOMAIN (Carpenter et al., 1993) calcula una matriz de distancias de Gower entre los puntos (esta medida de distancia permite combinar variables continuas y categóricas: Gower, 1971), usando solo datos de presencia y un número limitado de variables ambientales. Con esta matriz se genera un mapa de intervalos de confianza, que luego se transforma a datos binarios (presencia/ausencia). Los valores representan la similitud entre cada unidad de área y el conjunto de presencias, y se interpretan como límites de confianza. DOMAIN produce un índice de hábitat idóneo en una escala continua (0-100), donde las puntuaciones más altas (por ejemplo, >90) se consideran altamente adecuadas.

En el modelado, se utilizaron 19 variables bioclimáticas derivadas de WORLDCLIM 1.4 (Hijmans et al., 2005), con una resolución espacial de 2.5min (~4 km²) (Tabla 5). Estas variables pueden representar tendencias anuales, estacionalidad o factores limitantes o extremos. En las mismas se define como “cuartos” a períodos de tres meses que no necesariamente coinciden con las estaciones.

Usualmente, el 25% de los sitios no se incluyen en el modelado, ya que serán utilizados como control del mismo, pero en este caso, que sólo se cuenta con 31 sitios, se decidió ejecutar ambos modelos con el total de los sitios. BIOCLIM es representado en percentiles, mientras que DOMAIN se expresa de manera porcentual, graficándose el rango entre 75-100.

A continuación, para evaluar los modelos, se generaron al azar 10 muestras de 8 sitios (el 25% del total), que fueron descartados del total para ejecutar modelos de prueba. Ambos modelos fueron ejecutados con el 75% restante en cada uno de los casos, y luego se determinó cuántos sitios del total original fueron capaces de detectar. Estos resultados se contrastaron estadísticamente utilizando la prueba T de Student para muestras independientes (α 0,01).

Finalmente, se ejecutaron ambos modelos, con la totalidad de los sitios, en la modalidad “most limiting factor”, que representa la variable que presentó el mayor rendimiento (“score”) en cada una de las celdas. Se evaluó la extensión (km²) de cada factor limitante.

3.3.3. Resultados

En la actualidad se cuenta con 31 hallazgos, 13 de los cuales fueron informados en publicaciones nacionales, y otros 18 corresponden a citas de los autores y a comunicaciones personales. La mayoría se localiza en las provincias de Corrientes, Buenos Aires y Entre Ríos, con casos aislados en norte de Santa Fe, Jujuy, Salta y norte de Córdoba (Tabla 4).

En cuanto al hospedador definitivo, 23 casos correspondieron a bovinos, 3 a ovinos, 2 explotaciones mixtas y 3 a Corzuelas (*Mazama goauzoupira*), pequeño cérvido silvestre. De acuerdo al material analizado, 18 casos

correspondieron a ejemplares adultos obtenidos de necropsias y 13 al hallazgo de huevos en materia fecal.

El área de distribución de los paramphistomidos de rumiantes, modelada por BIOCLIM ocupa una extensión de 38.332,94 km² (Figura 15), mientras que la modelada por DOMAIN se extiende en 139.517,83 km² (Figura 16).

En cuanto a la prueba de los modelos, DOMAIN fue capaz de predecir el 97,42% de los sitios, mientras que BIOCLIM predijo el 91,61%, existiendo diferencias significativas entre ambos ($p < 0,01$).

Las variables climáticas detectadas como limitantes, con mejor rendimiento, fueron las siguientes:

- BIOCLIM (Figura 17): i) Estacionalidad de la temperatura (Bio04), con una extensión de 19.026,2 km² (49,63% de la extensión total); ii) Rango de temperatura anual (Bio07), 3.168,48 km² (8,27%); y iii) Temperatura media del cuarto más húmedo (Bio08) y Rango de temperatura media diurna (Bio02), 2.967,83 km² (7,74%) y 2.963,31 km² (7,73%) respectivamente.

- DOMAIN (Figura 18): i) Temperatura media del cuarto más húmedo (Bio08), con una extensión de 18.528,02 km² (13,28% del total); ii) Precipitación del cuarto más cálido (Bio18), 18.067,18 km² (12,95%); y iii) Rango de temperatura media diurna (Bio02), 17.454,8 km² (12,51%).

3.3.4. Discusión

Como puede verse, la mayor concentración de esta parasitosis yace sobre la región centro - este del país, para ambos modelos.

En algunos de estos hallazgos es posible que se haya dado importación de ejemplares cuando se produce traslado de hacienda, como en el norte de

Córdoba. Este caso se trató de animales provenientes de Gdor. Virasoro (Corrientes), por lo cual es probable que los parásitos hayan sido importados con la hacienda, y no adquiridos *in situ*. Algo similar se presentó en los hallazgos de Salta, ya que fueron animales importados desde el Noreste Argentino. Teniendo en cuenta estos traslados, es posible que se halle parcialmente sobreestimada el área de distribución en lo relativo a estos sitios. Las variables limitantes presentan varios aspectos comunes resultantes en ambos modelos, especialmente los que vinculados a factores estacionales (Bio2, Bio4). Por otra parte, aparecen dos variables de alto score relacionadas a combinaciones de mayores valores de temperatura/humedad, como Bio8 y Bio18, particularmente en el modelado por DOMAIN, lo cual indica la mayor probabilidad de desarrollo de esta parasitosis en regiones donde anual o estacionalmente se cuenta con alto régimen de precipitaciones y temperaturas adecuadas para llevar a cabo el ciclo vital que implica que también estas condiciones permitan el desarrollo de las poblaciones de los potenciales HI. En este sentido, es bien sabido que en el caso de los lymnaeidos, el desarrollo se optimiza por encima de los 20°C, y se restringe por debajo de los 10°C (Acosta, 1994). Para algunos planórbidos, como *Drepanotrema* spp., se constató en regiones con temperaturas medias de aproximadamente 20°C, que el factor limitante para el desarrollo fue la desecación estacional producida entre Enero y Febrero principalmente (Rumi et al., 2007).

A pesar de que ambos modelos presentaron importantes diferencias en lo que hace a la superficie cubierta (resultados más conservadores aplicando BIOCLIM respecto a los de DOMAIN) se puede asumir que entre las ambas se hallen los límites de distribución reales. No obstante, en sucesivos estudios

sería posible cotejar el área obtenida con la de distribución presentada por los HI, la cual puede actuar como una variable determinante para ajustar las áreas de distribución aquí obtenidas.

Por último, este trabajo no sólo constituye una contribución a la casuística disponible en publicaciones hasta la fecha, sino que además, la continuidad en la búsqueda e identificación de nuevos casos, sobre la base de las pautas del conocimiento del origen (*in situ* o por traslado) de la parasitosis ofrece nuevos criterios de análisis de los posibles nuevos hallazgos que puedan presentarse en diferentes regiones del país.

Tabla 4. Características de los hallazgos de Paramphistomidos en la Argentina.

Sitio	Longitud	Latitud	Año	Material	Localidad	Provincia	HD	Género/especie
1	-58,0318	-29,476	1917	Adultos	Curuzu Cuatia	CORRIENTES	Bovinos	<i>Verdunia tricornata</i>
2	-57,45	-29,15	1962	Adultos	Corriéntes	CORRIENTES	Bovinos	<i>Balanorchis anastrophus</i>
3	-57,3524	-28,0036	1974	Adultos	San Miguel	CORRIENTES	Bovinos	<i>Balanorchis anastrophus</i>
4	-59,4003	-29,073	1993	Adultos	Avelaneda	SANTA FE	Bovinos	<i>Cotylophoron cotylophorum</i>
5	-58,39	-27,25	1994	Adultos	San Cayetano	CORRIENTES	Bovinos	<i>Cotylophoron cotylophorum</i>
6	-59,2001	-33,0901	1995	Adultos	Gualeguay	ENTRE RIOS	Ovinos	<i>Cotylophoron cotylophorum</i>
7	-59,25	-29,13	2001	Adultos	Goya	CORRIENTES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
8	-59,0203	-34,0557	2002	Adultos	Zarate	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum leydeni</i>
9	-58,141	-35,1029	2002	Huevos	Brandsen	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
10	-58,0057	-35,3367	2002	Adultos	Chascomus	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
11	-58,0057	-35,3367	2003	Adultos	Chascomus	BUENOS AIRES	Ovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
12	-58,4	-32,17	2003	Adultos	Villa Elisa	ENTRE RIOS	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
13	-59,2606	-32,523	2003	Huevos	Lazo	ENTRE RIOS	Mixto	<i>Paramphistomum leydeni</i>
14	-58,4249	-33,1818	2004	Adultos	Perdices	ENTRE RIOS	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
15	-58,1014	-35,1029	2005	Huevos	Brandsen	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
16	-62,3303	-36,1633	2005	Adultos	30 de Agosto	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
17	-58,59	-33,26	2005	Huevos	Celbas	ENTRE RIOS	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
18	-58,58	-30,39	2006	Adultos	Feliciano	ENTRE RIOS	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
19	-58,0057	-35,3367	2006	Adultos	Chascomus	BUENOS AIRES	Ovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
20	-64,04	-29,6	2007	Huevos	San Fco. del Chañar	CORDOBA	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
21	-58,0057	-35,3367	2008	Huevos	Chascomus	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
22	-58,0057	-35,3367	2008	Huevos	Chascomus	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
23	-59,2606	-32,523	2008	Huevos	Lazo	ENTRE RIOS	Mixto	<i>Paramphistomum sp.</i>
24	-58,0057	-35,3367	2008	Adultos	Chascomus	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
25	-58,2427	-35,1641	2008	Adultos	Loma Verde	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
26	-58,0057	-35,3367	2008	Adultos	Chascomus	BUENOS AIRES	Bovinos	<i>Paramphistomum leydeni</i>
27	-64,28	-24,55	2007	Huevos	Anta	SALTA	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
28	-64,5204	-24,1353	2007	Huevos	San Pedro	JUJUY	Bovinos	<i>Paramphistomum sp.</i>
29	-57,2239	-28,3773	2008	Huevos	Mercedes	CORRIENTES	Corzuela	<i>Paramphistomata</i>
30	-57,2237	-28,3719	2008	Huevos	Mercedes	CORRIENTES	Corzuela	<i>Paramphistomata</i>
31	-57,1755	-28,3719	2008	Huevos	Mercedes	CORRIENTES	Corzuela	<i>Paramphistomata</i>

(*) Corresponde a *B. anastrophus*. (**) Corresponderían al género *Paramphistomum*

Tabla 5. Variables bioclimáticas provistas en WORLDCLIM empleadas en el modelo.

Variable Bioclimática
Temperatura Media Anual (bio1)
Rango de temperatura media diurna (bio2)
Isotermalidad $(bio2/bio7)*100$ (bio3)
Estacionalidad de temperatura (desvío estándar *100) (bio4)
Temperatura máxima del mes más cálido (bio5)
Temperatura mínima del mes más frío (bio6)
Rango de temperatura anual (bio5-bio6) (bio7)
Temperatura media del cuarto más húmedo (bio8)
Temperatura media del cuarto más seco (bio9)
Temperatura media del cuarto más cálido (bio10)
Temperatura media del cuarto más frío (bio11)
Precipitación anual (bio12)
Precipitación del mes más húmedo (bio13)
Precipitación del mes más seco (bio14)
Estacionalidad de precipitaciones (coeficiente de variación) (bio15)
Precipitación del cuarto más húmedo (bio16)
Precipitación del cuarto más seco (bio17)
Precipitación del cuarto más cálido (bio18)
Precipitación del cuarto más frío (bio19)

3. 4. Hospedadores Intermediarios de *Paramphistomum leydeni*

3.4.1. Introducción

Entre los hospedadores intermediarios de la familia Paramphistomidae se han mencionado los géneros, *Anisus*, *Biomphalaria*, *Bulinus*, *Drepanotrema*, *Gyraulius*, *Helicorbis*, *Helisoma*, *Lymnaea* y *Planorbis*, entre otros (Sey, 1991).

Si solo se tienen en cuenta las descripciones previas de HI de *P. leydeni*, éstas provienen casi exclusivamente de la ex Unión Soviética (Sey, 1991), cuyos géneros allí presentes no se hallan en nuestro país. Es necesario entonces remontarse a descripciones latinoamericanas (Müller et al., 1992; Paiva, 1994; Pino y Morales, 1982; Silva Santos et al., 1986), aunque, salvo una de ellas, en general no especifican género y especie parasitaria.

Varios géneros pueden infectarse con cercarias muy similares a las de *Paramphistomum*, y presentar manchas oculares, como las pertenecientes a la familia Notocotylidae, e incluso numerosos amphistomas parásitos de vertebrados inferiores pueden parasitar caracoles, siendo este un hallazgo posible las regiones de estudio (Castro et al, 2007; Ostrowski, 1979; Ostrowski et al., 2003).

Con estas referencias, se procedió en el presente trabajo, a la búsqueda de potenciales HI infectados naturalmente, en establecimientos donde se conocía el desarrollo del ciclo completo del parásito, para luego intentar la infestación experimental en cepas de caracoles criados en laboratorio.

3.4.2. Materiales y Métodos

Entre diciembre de 2004 y diciembre de 2009, a diferentes intervalos, se realizó

búsqueda de planórbidos y lymnaeidos presentes en un establecimiento de Gualeguay, Entre Ríos (32° 52' S; 59° 25' O), de unas 1.000 hectáreas, donde se crían aproximadamente 700 bovinos razas Hereford y cruza, y una majada de unos 1500 ovinos, incluyendo las razas Corriedale, Hampshire Down, Romney Marsh, Ideal, y varias cruza entre ellas. Aquí se constató el desarrollo del ciclo completo del parásito y una infestación creciente con la edad y estacional en ovinos y bovinos.

Los caracoles fueron recuperados de los márgenes del arroyo Clé, afluente del río Gualeguay y de espejos de agua próximos, los cuales se encuentran en potreros inundables (Fig. 19).

La recolección de caracoles asociados a la vegetación acuática se realizó mediante coladores, de unos 20cm de diámetro aproximadamente, o bien a mano o con ayuda de varillas de madera en los casos en los que se encontraban en el barro. Una vez en el laboratorio, fueron diseccionados o bien expuestos a luz artificial por 24hs para favorecer la emergencia de cercarias, las cuales fueron identificadas mediante la clasificación propuesta por Sey (1991). Una parte de la muestra fue preservada en laboratorio para el desarrollo de una filial 1, aunque cabe mencionar que para *L. viatrix*, se emplearon no solo caracoles hijos de los recolectados a campo, sino también otros de una cepa de Laboratorio que se conserva en el CEDIVE desde 1996.

La identificación de las cercarias se realizó entre porta y cubreobjetos con ayuda de microscopía óptica a fin de visualización y fotografiar las estructuras internas. Los caracoles fueron examinados mediante técnicas estándar en el SERBYDE (Servicios en Bioensayos y Diagnósticos Ecotoxicológicos), de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (Universidad Nacional de La Plata).

Para realizar las infestaciones, los huevos fueron obtenidos de materia fecal o bien de adultos recuperados del rumen en necropsias, e incubados en solución fisiológica durante 24hs a 36°C, para favorecer la oviposición. Una vez obtenidos se colocaron en cajas plásticas conteniendo unos 1.000 huevos aproximadamente, y recubiertas con papel de aluminio, e incubados en estufa a temperatura constante de 25°C.

Para determinar el período de incubación óptimo se colocaron en las mismas condiciones cantidades definidas de huevos (prom.: 420; d.e.: 239,8), a fin de evaluar el porcentaje de eclosión a tiempo fijo (8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 días post incubación).

Las infestaciones experimentales se realizaron “en masa”, es decir, colocando los caracoles a infectar dentro de las cajas plásticas con miracidios recién eclosionados, permaneciendo allí por 4 a 6hs. Esta metodología se adoptó dado que en ensayos piloto anteriores, fue imposible la infestación empleando dos a cuatro miracidios por caracol. La mejora en la infestación mediante esta metodología también fue observada por otros autores (Willey, 1941). Una vez expuestos, fueron vueltos a sus recipientes (peceras con agua y vegetación en el caso de los planórbidos, o bien recipientes con barro y 1-2cm de agua para los lymnaeidos) y mantenidos en laboratorio a temperatura ambiente (18-20°C). Las prevalencias de la infestación entre géneros de gasterópodos, se compararon mediante prueba de Fischer.

3.4.3. Resultados

Los caracoles hallados se clasificaron como *Drepanotrema depressissimum* (Moricand, 1837) y *Biomphalaria peregrina* (D'Orbigny, 1835), mientras que los

lymnaeidos correspondieron a *Lymnaea viatrix* (D'Orbigny, 1835). Para el período en estudio, se recolectaron 2.230, 541 y 740 caracoles de cada especie, respectivamente.

Para *D. depressissimum* se encontraron 31 caracoles infectados con cercarias de trematodes (1,40%), de los cuales 22 (0,99 %), presentaron cercarias tipo *Paramphistomum*, más otro que contenía infestación simultánea por este tipo de cercarias y otras del tipo Notocotylidae. Además, cuatro ejemplares presentaron cercarias amphistoma, pero no del tipo "Cercaria Pigmentata", sino más bien de tipo "Cercaria Intermedia", con divertículos faríngeos y canales excretores que se extienden lateralmente, sin cruzamientos. Este tipo de cercaria fue descrita por Ostrowski de Nuñez (1979), como perteneciente a *Catadiscus uruguayensis*, parásito de renacuajos de *Hyla pulchella* y adultos de *Leptodactylus ocellatus* y *Lysapsus mantidactylus*. Además, en 2 ejemplares se encontraron cercarias Notocotylidae y en otros dos, furcocercarias (Fig. 20).

En *B. peregrina* en ningún caso se encontró infestación por cercarias de tipo amphistoma. No obstante, se hallaron tres ejemplares parasitados por furcocercarias (0,40%) (Fig. 20) y otros dos con echinocecarias (0,27%) (Fig. 21).

Entre los ejemplares recolectados de *L. viatrix*, siete (1,29%) resultaron parasitados por cercarias tipo *Paramphistomum*, las cuales fueron morfológicamente idénticas a las halladas en *D. depressissimum*. También se encontraron 23 ejemplares parasitados con cercarias de *Fasciola hepatica* (4,34%) (Fig. 21), aunque nunca se hallaron infestaciones simultáneas por más de un género parasitario en el mismo individuo.

Comparando los géneros *Lymnaea* y *Drepanotrema*, no se hallaron diferencias

en la tasa de infestación natural ($p=0,48$).

En cuanto a las infestaciones experimentales, los resultados de la exposición a miracidios de *P. leydeni* se detallan en la tabla 6. En dos ejemplares, se encontraron solamente redias, sin haber desarrollado cercarias cumplido el período prepatente, que en este caso fue de entre 55 y 62 días.

En términos generales, la eclosión de huevos fue siempre relativamente baja ya que, de la masa de huevos incubados nunca se superó el 10% de los huevos viables, es decir, que presentaban en su interior un miracidio desarrollado. Los mayores porcentajes de eclosión se produjeron entre los días 12 y 13 de incubación (Fig. 22).

El estímulo lumínico no pareció favorecer una rápida eclosión, como lo es, por ejemplo para *F. hepatica*, ya que la mayor cantidad de miracidios eclosionaron una vez superados los 30 minutos de exposición a la luz, mucho más tarde que lo que sucede generalmente para el ejemplo citado.

Tabla 6. Resultados de exposición de diferentes gasterópodos a miracidios de *Paramphistomum leydeni*.

	<i>D. depressissimum</i>	<i>B. peregrina</i>	<i>L. viatrix</i>
Expuestos	287	61	210
Sobrevivientes	191	58	158
Infectados	0	0	17
%	0	0	10,76

3.4.4. Discusión

Como se puede observar, las prevalencias de amphistomas en los caracoles infestados naturalmente son muy bajas. Esto coincide con informes realizados para otros géneros, como fue mencionado por Ostrowski de Nuñez et al.

(2003), donde la infestación natural por *Zygoctyle lunata* (paramphistomido de aves y roedores), fue hallada en 8 de 1.424 ejemplares de *B. peregrina*. De forma similar a estos resultados, Müller et al. (1992), encontraron infestación natural por cercarias tipo *Paramphistomum* en *D. kermatoides*, (morfológicamente muy similar a *D. depressissimum*), en sólo 13 de 569 caracoles revisados.

Contrariamente a lo mencionado para *B. tenagophila* por Silva Santos et al. (1986), los ejemplares hallados de *B. peregrina* nunca presentaron infestación por paramphistómidos, pero debe tenerse en cuenta que la distribución de *B. tenagophila* se presenta en nichos, en tanto *B. peregrina* tiene una distribución más dispersa en la región donde se realizó el presente estudio (Rumi et al., 1997).

En cuanto a *L.viatrix*, reportes de infestación natural en *L. truncatula* y *L. columella* por paramphistomidos, en Colombia arrojaron prevalencias entre el 4,32 y el 41,0% (López et al., 2008), superiores a las halladas en este trabajo.

Según las descripciones que abarcan desde América del Norte hasta el norte de América del Sur (Castro Trejo et al., 1990; López et al., 2008; Pino y Morales, 1982), los lymnaeidos jugarían un rol fundamental en la transmisión de la paramphistomosis, no obstante, en nuestro medio parece no ser lo mismo, ya que la prevalencia en planorbidos y lymnaeidos naturalmente infectados fue similar. Además, en esas descripciones se mencionan otras especies de paramphistómidos, por cuanto podría sospecharse que otros géneros y especies podrían infectar más fácilmente a los lymnaeidos, en tanto la afinidad de *P. leydeni* hacia aquellos no sería tan específica.

En cuanto a las infestaciones experimentales, no fue posible realizarlas en el

género *Drepanotrema*, no obstante su ocurrencia en forma natural señala que esto es factible, por cuanto se debe continuar el intento de infección con diferentes metodologías. En tal caso, los resultados experimentales parecen apoyar en parte el rol de los lymnaeidos como transmisores, tal como ocurre en el hemisferio norte, aunque como se mencionó, no hubo diferencias entre géneros en los infectados naturalmente.

El tropismo de los miracidios recién eclosionados hacia los caracoles parece ser bastante bajo, sea cual sea el género de HI expuesto, dado que nunca se observó adhesión y las infestaciones solo pudieron realizarse exitosamente cuando los caracoles se expusieron “en masa”, y nunca en forma individual.

En contraste, en observaciones realizadas al exponer la misma línea de lymnaeidos a especies alopátricas de paramphistomidos (*Calicophoron daubneyi* originarios de Francia), no solo se obtuvo infestación mediante el empleo dos miracidios, sino que además el comportamiento de éstos fue mas agresivo, ya que casi al instante de eclosionar se dirigían hacia los caracoles (Sanabria et al., no publicado). Opuestamente, si se compara con otros trematodes, como por ejemplo *F.hepatica* respecto a su HI local *L. viatrix* (Nari et al., 1986; Venturini, 1990), *P. leydeni* no parece mostrar la misma afinidad y facilidad de infestación.

Estos resultados orientan en forma preliminar hacia dos especies de diferentes géneros que actuarían como HI de *P. leydeni*. Queda aún por aclarar el protagonismo de cada uno en la trasmisión mediante estudios sucesivos, sobre todo por el sesgo que muestran los resultados experimentales.

3. 5. Desarrollo de *Paramphistomum leydeni* en el hospedador definitivo

3.5.1. Introducción

Tomando a los ovinos como modelo, se realizó la infestación experimental de animales con las cercarias disponibles a fin de corroborar la infestación y medir parámetros propios del ciclo.

3.5.2. Materiales y Métodos

Para realizar las infestaciones se recuperaron metacercarias a partir de ejemplares infectados naturalmente de *D. depressissimum* (aproximadamente 80 metacercarias) y otras se recolectaron de ejemplares de *L. viatrix* (cepa de laboratorio denominada "U"), expuestos a miracidios de *Paramphistomum* (aproximadamente 600 metacercarias). En todos los casos las mismas fueron conservadas a 4°C durante no más de 60 días.

Cuatro ovinos cruza, de entre 1 y 2 años de edad, fueron identificados con caravanas auriculares y desparasitados frente a nematodos gastrointestinales con una mezcla de Albendazol (7,5mg/Kg) y Levamisol (7,5mg/Kg). Quince días después, fueron dosificados en forma intraruminal con 150 metacercarias cada uno, obtenidas a partir de *L. viatrix*, en tanto otros dos recibieron por la misma vía unas 40 metacercarias cada uno, de las recuperadas de *D. depressissimum*.

Todos los animales provenían del mismo establecimiento, donde no se registraron antecedentes de infestación por paramphistomidos en bovinos y ovinos y además resultaron negativos los exámenes coprológicos.

Una vez inoculados, se mantuvieron en corrales en el laboratorio, con piso de cemento o enrejado de madera, con agua *ad libitum* y alimentados con fardo de alfalfa y maíz una vez al día.

Teniendo en cuenta el período prepatente mínimo descrito para otros paramphistómidos en ovinos (Horak, 1971, Rolfe et al., 1994), se realizaron exámenes coprológicos individuales desde los 60 días post inoculación, a razón de 3 veces por semana durante el primer mes y pasados los 3 meses post inoculación, se realizó diariamente, mediante la técnica de filtración y sedimentación de Ueno y Gonçalves (1988).

Los animales se sacrificaron aproximadamente a los 5 meses post infestación, salvo uno de los infectados con 40 mtc, que fue sacrificado a los 94 días post infestación.

En la necropsia, se recolectó y revisó: material de los primeros 5m de intestino (mediante enterótomo) y sus paredes en búsqueda de parásitos, todo el líquido abomasal y el contenido ruminal.

El material recuperado fue luego examinado bajo lupa estereoscópica en su totalidad. Luego los parásitos fueron relajados en solución fisiológica a 36°C, y medidos con calibre mecánico.

3.5.3 Resultados

En los muestreos realizados, ningún animal revisado mediante coprología eliminó huevos en materia fecal. De los seis ovinos inoculados, sólo se encontraron parásitos en aquellos que recibieron metacercarias halladas en *D.depressissimum*. Del animal que se sacrificó a los tres meses post inoculación se recuperaron siete ejemplares inmaduros (todavía no

presentaban desarrollo de huevos en el oviducto) (Fig. 23) a nivel de la unión retículo-ruminal, sin otros hallazgos en el resto del tracto digestivo examinado. Del otro ovino inoculado, con el mismo tipo de cercarias, se recuperaron tres paramphistómidos adultos en el rumen, en la misma situación anatómica, sin encontrarse otros hallazgos en el resto del digestivo. Los ejemplares recuperados midieron en promedio 3,61 mm (rango: 3,05-4,00 mm).

3.5.4. Discusión

Pese a que *L.viatrix* mostró, al menos en condiciones experimentales, más aptitud como HI que *D. depressissimum*, sólo las cercarias desarrolladas en este último resultaron infectantes para los ovinos.

Para analizar este hecho varios factores deberían tenerse en cuenta. En primer lugar, algunos autores observaron que existen diferencias en la prepatencia al realizar infestaciones experimentales en bovinos, respecto a la prepatencia en otros HD: Horak (1967), determinó que hasta los 21 días de infestación (cuando aún solo hay ejemplares inmaduros), se recuperaron mayores conteos parasitarios de los ovinos que de los bovinos, no obstante, en la medida que transcurría el tiempo de infestación, la carga parasitaria se mantenía constante en los bovinos, mientras iba decreciendo en los ovinos.

En el mismo estudio, los ejemplares recuperados de bovinos fueron más grandes que los de ovinos, y el período prepatente fue de 56 días para los primeros, y de 71 días para los últimos, lo cual hace pensar que *a priori* los ovinos no son mejores HD que los bovinos.

Factores inmunitarios propios de los animales también podrían actuar como variables incidentes, eliminando así la mayoría de los parásitos inoculados, tal

como menciona Horak (1965). Sin embargo, las observaciones a campo mostraron que aún los adultos presentan infestaciones persistentes, y de hecho los animales inoculados provinieron de establecimientos sin antecedentes de infestación por paramphistomidos, por cuanto carecieron de contacto previo.

Otro factor a tener en cuenta es la ploidía, ya que se ha comprobado su variabilidad en algunos trematodes (Dreyfuss y Rondelaud, 2008). Es conocido en linajes asiáticos de *F. hepatica*, la presencia de individuos, diploides, triploides e híbridos (Ichikawa e Itagaki, 2010), habiéndose identificado formas triploides azoospérmicas que inducen reproducción asexual (partenogénesis), y para el caso de *Paragonimus westermani*, la ploidía parece influir directamente tanto en el tiempo de maduración, como en la localización dentro del HD, y en la patogenicidad para diferentes especies (Dreyfuss y Rondelaud, 2008).

En otro orden, Zavodna et al. (2008), hallaron que el background genético del HI podría influir directamente en el posterior desarrollo en el HD. En su experimento, infectando dos cepas alopátricas de *Biomphalaria glabrata* con *Schistosoma mansoni*, obtuvieron significativamente mayor número de adultos en ratones con una de las cepas *versus* la otra. Si bien, para este experimento no se cuenta con mayor evidencia que demuestre un paralelismo con esos hallazgos, es posible que esto también suceda, sobre todo teniendo en cuenta que en el presente trabajo se trata de distintos géneros de caracoles, y de un parásito de aparición reciente en la región de estudio.

Es necesario continuar con mayores estudios comparativos de infestación con cercarias obtenidas en distintos HI a fin de profundizar en el conocimiento de las relaciones entre este parásito y sus huéspedes.

3. 6. Relaciones entre adultos de *P. leydeni* y estadios larvales hallados en los HI, mediante caracterización molecular de los segmentos ITS del rDNA.

3.6.1. Introducción

A fin de aportar más elementos que pongan en claro la participación de los HI encontrados en el ciclo vital de *P. leydeni*, y su posible influencia en la subsecuente infestación en los ovinos, se buscó caracterizar, mediante técnicas moleculares, los estadios adultos y compararlos con los larvarios obtenidos en los caracoles y los huevos con que se realizaron las infestaciones.

Particularmente para el caso de los lymnaeidos, la sistemática es controvertida, dado que de lo que se conocía originalmente como *Lymnaea viatrix*, se han desprendido distintas especies y subespecies, como *L. viatrix ventricosa*, *L. neotropica*, (Bargues et al., 2007a) e incluso se ha citado la presencia de *Galba truncatula* en la región cordillerana (Bargues et al., 2007b).

Por tales motivos, el objetivo de este trabajo fue, la búsqueda de relaciones entre el material obtenido en las infestaciones experimentales y el recolectado a campo (del mismo origen), mediante caracterización molecular, a fin intentar explicar los diferentes patrones de infestación observados en el HD, así como caracterizar los caracoles involucrados en el ciclo.

3.6.2. Materiales y Métodos

Se comparó el segmento ITS2+ del rDNA de los diferentes estadios del ciclo vital. Para ello, se utilizaron ejemplares adultos de *P. leydeni* obtenidos de

necropsias realizadas en ovinos adultos, y otros recuperados del rumen de uno de los ovinos inoculados con metacercarias obtenidas en *D. depressissimum*. También se agregaron unos 100 huevos obtenidos de ejemplares adultos de *P. leydeni*, 50 cercarias obtenidas de infestaciones experimentales en *L. viatrix* (utilizando una cepa de laboratorio denominada U) y otras 23 metacercarias recuperadas de *D. depressissimum* infectados naturalmente. Para caracterizar a los hospedadores intermediarios, se seccionó el pie de 1 ejemplar de *D. depressissimum* y otros dos de *L. viatrix* experimentalmente infectados pertenecientes a dos cepas de laboratorio distintas, una originaria de Paysandú (32°18'26" S; 58°02'21" O), Uruguay (cepa U) y otra de San Pedro (33°42'20" S; 59°34'37" O), Prov. de Buenos Aires (cepa SP).

Todo el material proveniente de infestaciones naturales fue recolectado en el mismo establecimiento. El método de preservación para todas las muestras fue el congelado a -20°C, salvo los huevos, que fueron mantenidos en heladera a 4°C.

La extracción de ADN se realizó mediante el empleo del kit de purificación Wizard Genomics (Promega, USA). Para amplificar el segmento ITS2+ de los paramphistómidos adultos, huevos y formas larvales, se emplearon los mismos primers y condiciones previamente descritos, en tanto para los caracoles se amplificó el segmento ITS1+ utilizando los primers:

ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') e ITS1R (5'-ACGAGCGAGTGATCCACCGC-3') (Carvalho et al., 2004). Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 100 µl, siguiendo el protocolo indicado en Vidigal et al. (2000), excepto por la temperatura de annealing, que fue de 60°C.

Los productos de amphiomas amplificados fueron sometidos a restricción mediante las endonucleasas *HhaI* y *HinfI* (Fermentas Life Science, EU), siguiendo las instrucciones y buffers indicados por el fabricante. De la misma manera, los productos resultantes de la amplificación del segmento ITS1+ de los caracoles se incubaron con la enzima *HpyF3I* (*DdeI*) (Fermentas Life Science, EU). Las reacciones se produjeron agregando 0,3 µl de cada enzima a 5µl de cada amplicon, e incubados en baño seco por 1 hora a 37°C.

Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa al 1%, o al 2,5% para el caso de los fragmentos de restricción, teñidos con SybrSafe (Invitrogen), y revelados mediante transiluminador de luz azul (Safe Imager, Invitrogen), empleando marcadores de peso molecular de 100bp o 50bp. El peso molecular de las bandas fue determinado mediante el software GelAnalyzer 2010a.

Parte del material amplificado, fue purificado por precipitación con polietilenglicol según la técnica de Kusukawa et al. (1990), y enviado al IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria, Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata), para secuenciación DYEsequenciator (GE Helathcare). Las secuencias se realizaron en ambos sentidos (anterior y posterior), a fin de obtener luego una secuencia consenso entre ambas. Las mismas se analizaron mediante el software FinchTV 1.4.0. (Geospiza Inc.), en tanto la alineación entre secuencias forward y reverse, como la comparación con otras disponibles se realizó mediante la herramienta en línea BLASTN (NCBI).

3.6.3. Resultados

Salvo las muestras de metacercarias obtenidas de *D.depressissimum*, las

cuales no resultaron amplificadas, los otros amphistomas (adultos, huevos y cercarias) amplificaron bandas de ~ 500 bp. Al cortarse con enzimas de restricción, todos arrojaron fragmentos iguales de 220 y 280 bp con la enzima *HhaI*, y de 130, 170 y 200 bp con la enzima *HinfI* (Fig. 24 y 25).

Las secuencias correspondientes a los ejemplares obtenidos de infestaciones naturales en ovinos, así como las de los adultos obtenidos de infestaciones experimentales con cercarias de *D. depressissimum*, corresponden a dos de las secuencias previamente informadas, por lo tanto solo se secuenciaron los amplificados obtenidos a partir de huevos de *P. leydeni*, y las cercarias obtenidas en *L. viatrix*. Al ser comparadas con otras secuencias disponibles, los huevos de *P. leydeni* mostraron mayor homología con las secuencias previamente reportadas de *P. leydeni*. No obstante, las redias y cercarias secuenciadas fueron 100% homólogas con otro paramphistómido de los rumiantes, *Calicophoron microbothrioides*, en tanto la homología con *P. leydeni* fue del 97%.

Respecto al segmento ITS1+ de los caracoles, los amplificados de PCR resultaron en bandas de ~600 bp para *L. viatrix* cepa SP y de ~650 bp para *L. viatrix* cepa U y *D. depressissimum*. Al cortarse con la enzima *HpyF3I*, produjeron fragmentos de 90, 130 y 380 bp para *L. viatrix* SP, 120, 130 y 400 bp para *L. viatrix* U, y 280 y 370 bp para *D. depressissimum* (Fig. 26).

Al comparar las secuencias de ambos lymnaeidos con las disponibles en la base de datos de NCBI, la cepa denominada U mostró mayor similitud con *L. viatrix ventricosa* y *L. viatrix*, (GenBank, accession numbers AM412227 y HQ283254, respectivamente) (Fig. 27) en tanto la cepa SP se mostró más cercana a *L. neotropica*, (Bargues et al., 2007a) (GenBank, accession number

AM412228), con un 100% de homología (Fig. 28).

3.6.4. Discusión

Aunque las metacercarias obtenidas en *D. depressissimum* no pudieron ser amplificadas, sí lo hicieron el resto de los estadios componentes del ciclo a fin de corroborar similitudes y diferencias. De esta forma, se observó similitud tanto en su peso molecular como en los fragmentos de restricción que presentaron. No obstante, es llamativa la aparición de una secuencia distinta en las cercarias obtenidas de *L. viatrix*, pese a que tanto los huevos con que se realizaron infestaciones, como los adultos recuperados de necropsias e incluso los planorbidos de los que se recuperaron metacercarias, provinieron del mismo establecimiento. Aunque los patrones de restricción resultaron iguales en todas las muestras, debe tenerse en cuenta que los sitios de restricción para ambas enzimas (*HhaI* y *HinfI*) se conservan entre ambas secuencias.

Respecto a este hallazgo, existen varias posibilidades. En primer lugar, la presente comparación se realizó sobre el supuesto de que formas larvarias presentan el mismo pool genético que los adultos, pero podría no ser así. En tal caso, una posibilidad es que se trate de un mismo género y especie (*P. leydeni*) que, ante determinadas circunstancias, exhiban polimorfismo para el marcador utilizado, como fue observado por Semyanova et al. (2005), para el marcador ITS2+ en *F. hepatica* y para *F. gigantica*, pero comparando adultos de distintos orígenes. De forma similar, Cancela et al. (2010), encontraron que sobre 500 clusters correspondientes a marcadores expresados en formas juveniles de *F. hepatica*, varios de ellos no se hallan presentes en los adultos, es decir que la expresión genética puede en parte diferir entre distintos

estadios del parásito. De ser así, el marcador ITS2+ podría no ser suficiente para clasificar a los paramphistomidos en forma precisa en todos sus estadios, y se necesitaría del auxilio de marcadores adicionales. Además, este supuesto revalida la importancia de la clasificación morfológica, que pese a ser compleja y controvertida, es indispensable para poder analizar la información globalmente.

Puede también suponerse que existe localmente otra entidad distinta a *P. leydeni*, no descrita hasta el momento, aún cuando se corroboró la identidad de varios aislamientos tanto en bovinos como en ovinos (Sanabria et al., 2011). *Calicophoron microbothrioides*, descrito en Norte y Centroamérica (Sey, 1991), aún no se ha documentado para Sudamérica. Si se tienen en cuenta las teorías de llegada de los Paramphistomidos a América del Sur (Sey, 1991), es probable la presencia de esta especie en nuestro país.

Otro factor a tener en cuenta, es que el HI podría influir en la diversificación genética de los parásitos, de forma similar a lo descrito por Zavodna et al. (2008) para *Schistosoma mansoni*, o como fue documentado para el ciclo de *P. westermanni*, donde dos cepas alopátricas del segundo HI (*Cambaroides similis*), influyeron en el tamaño de las metacercarias y luego de adultos, los que luego produjeron diferentes tamaños de huevos (Park et al., 2001).

Se debe tener en cuenta que los HI hallados para *P. leydeni* pertenecen a dos géneros (*Lymnaea* y *Drepanotrema*) y que las cepas de *Lymnaea viatrix* empleadas en este estudio, según nuestros resultados de secuenciación, se diferencian bien y asocian a dos especies: la cepa U (Paysandú, Uruguay) a *L. viatrix ventricosa* y la cepa SP (San Pedro, Argentina) a *L. neotropica*. Es decir, existen potencialmente tres HI distintos, cada uno de los cuales podría

influir, de manera diferente, en el desarrollo posterior del ciclo.

Sin duda resta aún profundizar en el conocimiento de estos y otros aspectos de las interacciones parásito-hospedador que permitan comprender la complejidad de procesos que deben establecerse para que tal interacción se pueda sostener en tiempo y espacio. Las técnicas moleculares ofrecen una importante ayuda, no obstante los resultados deben ser soportados por más estudios experimentales de infestación.

3. 7. Tendencia y estacionalidad en la infestación por *Paramphistomum leydeni* en ovinos.

3.7.1. Introducción

La distribución y presencia de los paramphistomidos, como se vio más arriba, es fuertemente influenciada y determinada por factores ambientales, no sólo inciden en sus formas libres (huevos, metacercarias), sino también sobre la distribución y frecuencia de los HI y HD. La variación anual de estos factores producirá condiciones variables de las probabilidades de infestación de hospedadores por parte del parásito.

Rolfe et al. (1991), en un estudio de dos años detectaron que la mayor tasa de infestación se producía en dos picos definidos en verano-otoño para el primer año, y en otoño- invierno para el segundo, correspondiéndose con incrementos en los HPG a fines de invierno y principios de primavera, respectivamente. Por otra parte, Rangel Ruiz et al. (2002), detectaron mayores infestaciones en los animales en verano, y luego otoño hasta principios de invierno, después de las lluvias, de forma similar a lo reportado previamente por Gupta et al. (1985) en India y Díaz et al. (2007) en España. Estos reportes indican que hay observaciones más o menos constantes respecto a la estacionalidad de las infestaciones, y a la distribución anual de las precipitaciones como uno de los factores predisponentes más importantes.

Por otra parte, no se cuenta con datos acerca del inicio de las infestaciones en el ganado, aunque seguramente están influidas por muchos factores: intrínsecos a la población (inmunidad, edad, especie), así como otros propios de los sistemas de explotación.

Por lo expuesto, en el presente trabajo se relacionaron variables climáticas con la infestación por *P. leydeni* en ovinos, medido indirectamente a través de la excreción de huevos en materia fecal, así como la dinámica de la infestación en un período de tres años.

3.7.2. Materiales y Métodos

Muestras

Durante los años 2005 a 2007, en visitas regulares al establecimiento donde se realizaron el resto de los ensayos, se tomaron al azar entre 30 y 40 muestras de materia fecal a una parte de la majada que pastorea en uno de los potreros inundables, cercanos al arroyo Clé, contabilizando un total de 20 muestreos repartidos estacionalmente, sumando 722 muestras en total. Además, en cada uno de los tres años, 20 corderas por año fueron identificadas mediante caravanas auriculares, y muestreadas aproximadamente en cada evento con el fin de verificar el inicio de eliminación de huevos en material fecal. Las muestras fueron procesadas mediante filtración y sedimentación como fuera previamente descrito (Ueno y Gonçalves, 1988), y para cada muestreo se calculó la media aritmética (MA), media geométrica (MG) de los HPG y tasa de positividad ($TP = \text{positivos} / \text{muestras tomadas}$). Se recopilaron además datos mensuales de precipitaciones, temperaturas, y exceso hídrico en el suelo (EHS), los cuales fueron suministrados por la Dirección de Hidráulica de la Provincia de Entre Ríos, para la zona de estudio.

Análisis de los datos

Dado el número y tipo de muestreos realizados, se optó por un análisis de K-medias de los datos climáticos para la identificación de grupos

“meteorológicos”.

Una vez identificados, los grupos fueron relacionados con los valores de HPG obtenidos mediante un modelo de regresión de poder ($\text{Ln}(\text{Infest}) = -1.4 + 0.43 \text{Ln}(\text{Pptac})$).

Para verificar el momento del inicio de la infestación, los valores de HPG de corderas, para cada muestreo, fueron comparados entre sí mediante análisis de varianza de una vía, para cada año, y luego comparación de medias por la prueba HSD de Tukey.

3.7.3. Resultados

Se identificaron 3 grupos de datos cuyos valores se expresan a continuación en promedio seguido de desvío estándar (Fig. 29):

Grupo 1: Bajas temperaturas (12,9 °C; 2,8) junto con bajas precipitaciones (24,9 mm; 16,7) y EHS (0,7 mm; 2,4), con n=11.

Grupo 2: Altas temperaturas (19,9 °C; 3,3), moderadas precipitaciones (96,2 mm; 22,3) y EHS (8,9 mm; 16,4), con n=15.

Grupo 3: Altas temperaturas (19,6 °C; 4,9), asociadas a altas precipitaciones (176 mm; 31,7) y EHS (62,4 mm; 35,7), con, n=8.

Las prevalencias de infestación no difirieron significativamente entre las muestras del 3 grupo (65,8 a 76,3%), no obstante, se observó un aumento en la MG y MA del grupo 1 al grupo 3 (de 4,1 a 7,1 y 11,6 para las MA de los grupos 1 a 3, respectivamente). Además los valores de HPG del grupo 1 fueron significativamente diferentes de los del grupo 3 (prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.05$).

A pesar del bajo poder explicativo estimado ($R^2=0.05$; Diferencias significativas

$p < 0.0001$), este modelo de regresión indica que la variable precipitaciones actúa como factor limitante cuando son menores de 90mm, en tanto el incremento de los HPG en relación a las lluvias fue bajo (Fig. 30).

Los conteos de huevos en materia fecal de las corderas, que fueron infectándose naturalmente, difirieron significativamente en los meses de octubre ($p = 0,0001$) y diciembre ($p = 0,009$) respecto al resto del año. De octubre a diciembre ($p = 0,0001$), para los años 2005, 2006 y 2007, respectivamente (Fig. 31).

3.7.4. Discusión

Considerando los grupos de datos climatológicos identificados por el modelo de K-medias: los del grupo 1 pertenecieron principalmente a aquellos muestreos realizados en meses de invierno, en tanto los del grupo 2 a primavera-otoño y los del grupo 3 a meses de primavera y verano. Debe tenerse en cuenta que el período prepatente en los ovinos resultó superior a los 3 meses por lo cual, las mayores tasas de eliminación de huevos observadas en el grupo 3 estarían correlacionadas con infestaciones en al menos una estación anterior, pero que se expresaron casi en forma constante hacia la primavera-verano. Teniendo además en cuenta los datos aportados por el modelo de regresión, puede decirse en líneas generales que, los meses en los que las precipitaciones estuvieron por debajo de 100mm asociados a temperaturas de 13°C no fueron favorables para la infestación, en términos de eliminación de huevos.

De acuerdo al período prepatente descrito para los paramphistomidos (Horak, 1971; Sey, 1992) y las observaciones de infestaciones experimentales realizadas en el presente trabajo, el seguimiento de corderas que se infectaron

naturalmente mostró la misma tendencia, con incremento de los HPG hacia la primavera y principios del verano, lo cual indica una mayor tasa de infestación adquirida en otoño-invierno,. Estos picos de HPG también parecen relacionarse con las precipitaciones, ya que los valores más altos de HPG (MG) se vieron cuando ocurrió un gran incremento otoñal de las precipitaciones (642 mm en marzo 2007) acompañado de inundaciones.

Debido al sistema de explotación y la ocurrencia de la mayoría de las pariciones, no pudo constatarse la existencia de algún otro pico de eliminación de huevos, probablemente sucedido en otoño. En síntesis, los resultados indicarían la presencia de una estacionalidad marcada en la infestación, coincidente con lo mencionado por otros autores.

3. 8. Evaluación de Drogas frente a infestaciones por paramphistomidos: Eficacia de oxiclozanida al 10% en ovinos frente a *Paramphistomum leydeni*

3.8.1. Introducción

La Paramphistomosis se atribuye principalmente a las familias Paramphistomidae y Gastrothylacidae, distribuidos mundialmente (Sey, 1991). Existen reportes clínicos en diferentes regiones de Australia y Nueva Zelanda, India, Sudáfrica, y algunos países de Europa del este y central (Boray, 1959; Horak, 1971), que han registrado casos de amphistomosis intestinal con cierta frecuencia o estacionalidad. En otras regiones del mundo, se ha observado casuística en forma esporádica, no obstante algunos casos podrían presentarse en forma individual y a veces enmascarados o poco precisos (Sanabria y Romero, 2008). En los adultos, los tratamientos farmacológicos de los casos clínicos se enfocan en la eliminación de estadios inmaduros que, si bien no tiene un efecto directo sobre la salud del animal, reduce la contaminación ambiental con huevos.

La mayoría de las drogas fasciolicidas de uso corriente carecen o tienen muy bajo efecto en estadios adultos e inmaduros de paramphistomidos, como ya fue mencionado en la introducción.

La oxiclozanida pertenece al grupo de las salicilanilidas. Es una droga comúnmente empleada como fasciolicida, presentando en bovinos alta eficacia y amplio margen de seguridad (Sinclair, 1969), salvo por algunas restricciones en el período periparto (Spence et al., 1996).

Sey (1989), cita en su revisión una eficacia para este fármaco inferior al 90%

en paramphistómidos adultos en rumen, sin mención de acción en inmaduros, a dosis de 20mg/Kg. Por su parte Rolfe & Boray (1987a), combinado con levamisol, en un esquema de dos dosis y con tres días de intervalo, demostraron eficacia de 99-100% en bovinos, en adultos e inmaduros en dosis de 18,7mg/Kg, en tanto Paraud et al. (2009), encontraron una alta eficacia frente a adultos en cabras infectadas experimentalmente con *Calicophoron daubneyi*, a dosis de 15 y 22,5 mg/Kg, aunque la eficacia fue menor en estadios inmaduros. Spence et al. (1996), comprobaron reducción significativa en el recuento de huevos de paramphistomidos en vacas lecheras tratadas con 16,5 mg/Kg de Oxiclozanida versus los recuentos en controles no tratados, sin aportar estimaciones de eficacia.

El presente trabajo busca verificar estos resultados en ovinos parasitados naturalmente por *Paramphistomum leydeni*, mediante el tratamiento con una formulación oral de oxiclozanida en animales adultos, aplicando un esquema de dos dosis.

3.8.2. Materiales y Métodos

En un establecimiento con antecedentes de alta prevalencia a *Paramphistomum leydeni* tanto en ovinos como en bovinos, se tomaron al azar muestras de materia fecal de 20 ovejas adultas cruzas. Las muestras se procesaron mediante filtración y sedimentación (Ueno y Gonçalves, 1988), con una sensibilidad de 1 huevo en 2 grs de materia fecal. Se seleccionaron 15 animales con más de 20 huevos en 2 gramos, los cuales se dividieron en dos grupos: grupo 1 (G1), con cinco animales y grupo 2 (G2), con diez.

Los animales fueron separados y mantenidos en un potrero alto, lejos del resto

de la majada, se identificaron mediante caravana auricular y fueron pesados. Las ovejas del G1 permanecieron sin tratamiento durante todo el ensayo, en tanto las del G2 fueron tratadas con una formulación de oxiclozanida al 10% (Eco Milk ®, Laboratorio Cibeles, Uruguay), vía oral, a razón de 20 mg/Kg (día 0). Una segunda dosis fue administrada 72 hs luego de la primera (Día +3). A las 48 hs. de la segunda dosis (día +5), se sacrificaron los 5 animales pertenecientes al G1 y 5 animales del G2, procediendo de acuerdo al Animal terrestrial health code de la OIE para el sacrificio de animales (2008).

Además, en cada una de las fechas se tomaron muestras rectales de materia fecal de los 15 animales y se examinó su condición atendiendo a la posible presencia de respuestas a la toxicidad o reacciones adversas post dosificación. En la necropsia se examinaron los preestómagos, el abomaso y los cinco primeros metros de intestino delgado, dado que allí se encuentran más del 95% de los estadios inmaduros (Horak, 1971). El contenido ruminal fue cuidadosamente revisado, igual que las paredes del saco, en busca de ejemplares adheridos. El contenido de abomaso fue totalmente recuperado y luego tamizado por una malla de 250 micras, en búsqueda de ejemplares inmaduros. De la misma manera se procedió para el material intestinal luego de abrirlo mediante un enterótomo. Lo colectado en cada una de las vísceras fue dispuesto en envases individuales identificados, refrigerados y trasladados al laboratorio. La totalidad de las muestras fueron examinadas bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-2T) a 1,5 X, y los ejemplares fueron contados. La eficacia fue determinada por la formula $\%EFICACIA = 100 \times (G1 - G2 / G1)$, en tanto la eficacia coprológica, expresada en porcentaje de reducción del recuento de huevos del grupo tratado, se calculó a las 72 y 120 hs de la primer

dosis como %EFICACIA= $100 \times (G1(\text{dia}0) - G1(\text{día } x) / G1(\text{dia}0))$. Los valores por grupo y por fecha se calcularon como la media geométrica de los conteos individuales $(x+1)$, tanto para huevos en 2 grs. de materia fecal como para los conteos de parásitos. Los grupos se compararon mediante prueba de T para varianzas desiguales, en tanto las diferencias en conteos de huevos de animales tratados se compararon por fechas mediante prueba de T pareada.

3.8.3. Resultados

La fórmula resultó altamente eficaz en estadios adultos de *P. leydeni*, en el esquema de dosis empleado, en tanto sólo en uno de los animales se hallaron ejemplares inmaduros, el cual perteneció al G1 sin tratamiento (Tabla 7).

El porcentaje de reducción de huevos en materia fecal fue superior al 95% a las 72h luego de la primer dosis (día +3), y dicha reducción se acentuó (día +5), luego de la segunda dosis (Tabla 8).

Durante todo el ensayo los animales mostraron buen estado de salud, no observándose efectos adversos ni indicios de toxicidad en el G2.

Tabla 7. Conteo de parásitos en necropsias (medias geométricas y rango).

	Rumen	Abomaso	I. Delgado
G1	195,06 (59-498)	1,8 (0-18)(*)	1,51 (0-7)(*)
G2	1(0)	1(0)	1(0)
Eficacia	0,99	0,45	0,34
Signif (p<0,05)	0,015	0,18	0,18

(*) Los ejemplares inmaduros recuperados pertenecieron sólo a 1 animal.

Tabla 8. Reducción de huevos en material fecal en el grupo 2.

	Día 0	Día +3	Día +5
Media Geom	53,2	1,84	1,26
Rango	7-293	0-8	0-1
% Reducción	-	96	97
Signif. (p<0,05)	-	0,012	0,011

3.8.4. Discusión

De manera similar a lo reportado por Rolfe et al. (1987a) para otros géneros de paramphistómidos, la oxiclozanida resultó altamente eficaz frente a adultos de *P. leydeni* en ovinos, en un esquema de dos dosis, a 20mg/Kg.

Paraud et al. (2009), encontraron resultados similares con dosis de 15 y 22,5mg/Kg en una sola toma, lo cual parece corresponderse en este ensayo con los conteos de huevos en materia fecal a las 72hs, luego de la primera dosis. También es posible que una dosis única no sea suficiente para lograr concentraciones a nivel intestinal que permitan una eficacia superior al 95% en estadios inmaduros, de hecho, en su experimento, demostraron una eficacia sólo del 82% suministrando 22,5 mg/Kg de oxiclozanida.

Lamentablemente la baja tasa de infestación reciente en los ovinos no permitió corroborar en forma fehaciente el efecto sobre inmaduros. De hecho, la eficacia

relativa en abomaso e intestino delgado (Tabla 7) se encuentra subestimada, dado que se basa en el hallazgo de ejemplares inmaduros en solo una oveja. Seguramente esta acción a nivel intestinal sea el aspecto más atractivo de un fármaco para el tratamiento de la paramphistomosis, teniendo en cuenta que en casos agudos, y sobre todo en animales jóvenes, es muy probable que el tratamiento deba realizarse en forma preventiva, dado que puede no haber aún huevos en materia fecal, y el único indicio puede ser el antecedente de la endemicidad regional y los signos clínicos. Siguiendo pasos para la confirmación de los resultados, podrían ser el incremento de la cantidad de animales naturalmente infectados, con necropsias en invierno, ya que según se mencionó en el capítulo anterior, serían más probables de hallarse en ese momento. Otra forma sería aplicar este mismo esquema en infestaciones experimentales y repetir la medición comparativa de concentraciones alcanzadas por la droga en líquidos ruminal, abomasal e intestinal.

A diferencia de otras drogas evaluadas en diferentes ensayos frente a paramphistómidos (Horak, 1962, 1965), la oxiclozanida parece segura y en nuestra experiencia no demostró efectos adversos en ninguno de los diez animales tratados. De hecho, se indica incluso en vacas lecheras sin período de retirada, al parecer debido a que su mecanismo de acción y propiedades farmacocinéticas son distintas a otras salicilanilidas (closantel, nitroxylinil, rafoxanide) y no posee tan fuerte unión a proteínas plasmáticas (Melhorn, 2001). En síntesis, se considera que la oxiclozanida ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la paramphistomosis en los ovinos.

4. CONCLUSIONES

Para el sur de Entre Ríos y provincia de Buenos Aires, la paramphistomosis es una parasitosis emergente, dado que las primeras observaciones en la zona datan de no más de 10 a 15 años. Puntualmente en los registros propios para cuenca del salado norte, como zona de influencia del CEDIVE, los primeros hallazgos se produjeron a principios de la década del 2000 (Sánchez et al., 2005), casi conjuntamente con las inundaciones que afectaron toda la región. Experimentados veterinarios de campo han expresado alarma ante la novedad del hallazgo de ejemplares adultos en rumen, y adjudicado a estos responsabilidad de cuadros diarreicos (Fernández, 2004; Aliverti et al., 2008). El desconocimiento del ciclo de vida, patogenia y opciones terapéuticas a nivel local, muchas veces supuso errores en el diagnóstico clínico o llevó al empleo de tratamientos empíricos asumiendo resultados similares a los que se esperan frente a *F.hepatica*.

Por otra parte, y contrariamente a lo presentado en publicaciones anteriores, el género mas prevalente parece ser *Paramphistomum*, al ser clasificados los especímenes tanto por técnicas morfológicas como moleculares.

En la actualidad este parásito parece haberse distribuido de norte a centro-este del país, no obstante la probabilidad de su desarrollo podría extenderse algo hacia el centro-oeste, habiéndose evidenciado algunos focos esporádicos en otras áreas. De progresar variaciones climáticas regionales, podrían producirse nuevos escenarios apropiados para el desarrollo de los HI, con incremento de los hallazgos, de forma similar a lo pronosticado por otros autores en relación al incremento de fasciolosis y su relación con el cambio

climático (Fox et al., 2011). Por otra parte, el género *Balanorchis*, no parece haber expresado la misma expansión, por lo cual puede haber otros HI implicados en la transmisión de este ciclo.

El establecimiento de una parasitosis en una nueva región puede utilizar diferentes vías según su disponibilidad, por ejemplo: i) la adaptación o búsqueda del parásito hacia nuevos hospedadores intermediarios, en aquellos casos en que el parásito ingresa transportado por el HD, ii) la inclusión de ambos, HD y HI, en una nueva región, o bien iii) la colonización y adaptación de nuevos espacios por HI previamente infectados.

Entre fines de los '90 y principios de la década del 2000, varios factores y procesos pueden haber dado lugar a la transmisión de paramhistomidos en nuevas regiones: como se mencionó, uno de ellos muy probablemente fue la inundación observada en el año 2001 en el centro-este de la provincia de Buenos Aires, favoreciendo así el desplazamiento de moluscos infectados y la sucesiva infestación de nuevas generaciones mediante miracidios que requieren medio acuático para su desarrollo. Otro factor es el movimiento de hacienda, sobre todo de animales para engorde desde la Mesopotamia hacia Buenos Aires, donde existen zonas enzoóticas desde hace mucho tiempo.

Incrementos similares en la prevalencia han sido observados también en otras regiones del mundo en la década del '90 (Mage et al., 2002), aunque tal vez no siguiendo los mismos canales de diseminación.

Si bien existen similitudes entre los distintos géneros y especies, también hay diferencias en la interacción con diferentes hospedadores. La reclasificación del género no solo pone en claro la sistemática del grupo a nivel local, sino que también, contribuye en parte al conocimiento de la dispersión de los

paramphistomidos, y por otro lado permite identificar el comportamiento de una especie particular frente a los hospedadores locales.

En referencia a esto, son al menos dos los géneros de HI vinculados a la transmisión de *P. leydeni*, entre los cuales, *L. viatrix* parece más afín en forma experimental. En contraste, cuando se infectaron ovinos, solo aquellas metacercarias provenientes de *D. depressissimum* fueron capaces de infectar, con un período prepatente que, aparentemente, es bastante más prolongado que lo que normalmente ocurre, según cita la literatura. Pese a que mayor número de infestaciones hubiesen sido ideales, los ensayos han mostrado, al menos en forma preliminar, que el parásito se habría establecido recientemente y distintas relaciones entre HI, HD y parásito pueden estar teniendo lugar, a diferencia de otros ciclos de digeneos, con mayor facilidad de adaptación, e interacciones más antiguas. La biología molecular aporta elementos de gran utilidad al simplificar el procesamiento taxonómico, incluso sobre formas larvales pero, como se ha visto, no exime de las clasificaciones tradicionales, ya que ambos estudios deben actuar recíproca y complementariamente como aportes de información y contribución al diagnóstico y taxonomía del grupo.

La aparición de una secuencia diferente a lo descrito, sobre cercarias provenientes de individuos previamente clasificados, pone en duda algunos conceptos, pero a tales efectos vale la pena profundizar en los orígenes de estas diferencias, mediante estudios sucesivos en formas larvianas, e incluso mediante el empleo de marcadores moleculares adicionales.

Al igual que lo mencionado en otros trabajos, la patogenicidad parece ser muy baja, sumado a que los animales que están expuestos en campos donde se desarrolla el ciclo, cuentan con inmunidad previa, dada por contacto desde

jóvenes con cantidades bajas de metacercarias. Esto lleva a la escasa presentación de caso clínicos, ya que de hecho durante estos estudios ninguno fue confirmado fehacientemente. Por tal motivo, es posible que aún no estén dadas las condiciones para la expresión del potencial patógeno de esta parasitosis como sucede en otras regiones del mundo.

Las precipitaciones menores a 100mm mensuales, agregados a temperaturas menores a 13°C, parecen los factores limitantes para el desarrollo, lo cual puede estar condicionando este potencial, al menos en la región de estudio, en tanto más hacia el norte, mientras más se observen durante el año, y en forma más o menos constante, características similares a las del grupo climatológico 3, mayor será la facilidad de diseminación de esta parasitosis.

Respecto a los tratamientos, si bien no se cuentan con suficientes alternativas, existen drogas como la oxiclozanida que podrían actuar eficientemente en casos clínicos en caso de presentarse, dado que según lo que menciona la bibliografía, y de acuerdo a experiencias realizadas en CEDIVE evaluando drogas como Closantel, Nitroxinil y Triclabendazol en infestaciones mixtas por *F. hepatica* y *Paramphistomum*, estas no reducen los huevos de los últimos pese a ser efectivas frente a distomatosis hepática.

Cabe mencionar que nuevas hipótesis se han ido generando durante el desarrollo del trabajo de tesis, esto llevo a iniciar experiencias adicionales a las inicialmente planteadas y en otros sin embargo todavía quedan dudas por resolver. No obstante, el presente trabajo brinda información que permite establecer bases teóricas y empíricas para continuar investigando y precisando el conocimiento de la bionomía de estos trematodes y su incidencia sobre el estado sanitario del ganado en las áreas endémicas identificadas.

5. BIBLIOGRAFIA

ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., CABARET, J. 1999. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet. Res.* 30(1): 113-118.

ACOSTA, D. 1994. Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. En Nari, A., Fiel, C. (Eds): Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Hemisferio Sur, Montevideo Uruguay: 233-256.

ALARCÓN, E. P., VELÁSQUEZ, L. E. 2009. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 22: 168-177.

ALIVERTI, F., ALIVERTI, M., ALIVERTI, V. ARAUZ, S. 2008. Descripción de un caso clínico en bovinos de carne con diagnóstico de *Paramphistomum* sp. en un campo de cría en la provincia de Buenos Aires, hallazgos hematológicos y bioquímicos. Resúmenes de la XVII Reunión Científica Técnica de la AAVLD, Santa Fé. Póster P22.

AMATO, J. F. R., VELÁSQUEZ MALDONADO, J. J., AMATO, S. B. 1982. Infecções conjuntas de bovinos por *Balanorchis anatrophus* Fiscoeder, 1901, e *Paramphistomum* sp. (Trematoda: Paramphistomidae), no Rio Grande Do Sul, Brasil. *Rev. Brasil. Biol.* 42(2): 371-375.

ARRU, E., DEIANA, S., MUZZETTO, P. 1970. Paramphistomose intestinale dei ruminanti. Infestione esperimentale degli ovini con metacercariae ed esemplare immaturi di *Paramphistomum cervi* (Schrank, 1790). *Riv. Parassitol.* 12(1): 33-42.

AUGOT, D., ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G. 1996. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* subjected to successive unimiracial cross-exposures. *Parasitol. Res.* 82 (7): 623-627.

BARGUES, M.D., ARTIGAS, P., MERA Y SIERRA, R.L., POINTIER, J.P., MASCOMA, S. 2007a. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica n. sp.*, the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101: 621-641.

BARGUES, M.D, MERA Y SIERRA, R.L., GOMEZ, H.G., ARTIGAS, P., MASCOMA, S. 2007b. Caracterización molecular de *Galba truncatula*, vector principal de la fascioliasis en Argentina. Implicaciones en salud pública. *Enferm. Emerg.* 9: 77-82.

BORAY, J. C. 1959. Studies on intestinal amphistomosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 35: 282-287.

BOUVRY, M., RAU, M. E. 1984. *Paramphistomum* spp. in dairy cattle in Québec. *Can. Vet. J.* 25: 353-356.

BULMAN, G. M., CARACOSTANTÓGOLO, J., LAMBERTI, J. C., ZENÓN, A. A., BALBIANI, G. 2002. *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901) (Digenea: Paramphistomidae), trematode del rumen bovino en Argentina. *Vet. Argent.* 19: 673–682.

BUSBY, J. 1991. BIOCLIM - a bioclimate analysis and prediction system. *En C.* Margules, and M. Austin, editores. Nature conservation: cost effective biological surveys and data analysis. CSIRO, Camberra: 64–68.

CANCELA, M., RUÉTALO, N., DELL'OCA, N., DA SILVA, E., SMIRCICH, P., RINALDI, G., ROCHE, L., CARMONA, C., ALVAREZ-VALÍN, F., ZAHA, A., TORT, J. 2010. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* 11: 227.

CARPENTER, G., GILLISON, A., WINTER, J. 1993. DOMAIN a flexible modelling procedure for mapping potential distributions of plants and animals. *Biodivers. Conserv.* 2: 667-680.

CARVALHO, O. S., CARDOSO, P. C. M., LIRA, P. M., RUMI, A., ROCHE, A., BERNE, E., MÜLLER, G., CALDEIRA, R. L. 2004. The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea*

columella, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). *Mem. I. Oswaldo Cruz.* (99): 503-507

CASTRO TREJO, L., GARCIA VAZQUEZ, Z., CASILDO NIETO, J. 1990. The susceptibility of lymnaeid snails to *Paramphistomum cervi* infection in Mexico. *Vet. Parasitol.* 35: 157–161.

CASTRO, O., DE SOUZA, C. G., VENZAL, J. M. 2007. Incidencia de cercarias (Trematoda: Digenea) en una población de *Drepanotrema heloicum* (D'Orbigny, 1835) (Mollusca: Planorbidae) de un área suburbana del departamento de Canelones, Uruguay. *Com. Soc. Malacol. Urug.* 9(90): 101-107.

COSTA, H. M. A., GUIMARAES, M. P. 1992. *Cotylophoron Travassosi* sp. n. (Trematoda—Paramphistomidae) from cattle. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 87: 69-72.

COSTA, H. M. A., GUIMARAES, M. P., CALDEIRA, M. C. M., MIRANDA, M. A. 1999. Morphological aspects of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda-Paramphistomata). *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.* 8 (1): 67-70.

DAR, Y., VIGNOLES, P., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G. 2004. Larval productivity of *Fasciola gigantica* in two lymnaeid snails. *J. Helminthol.* 78(3): 215-218.

DÍAZ, P., PEDREIRA, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ J. L., ARIAS, M.

S., FRANCISCO, I., FERNANDEZ, G., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A. 2007. Risk periods of infection by *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) in cattle from oceanic climates areas. *Parasitol. Res.* 101(2): 339-342.

DINNIK, J. A., DINNIK, N. N. 1954. The life cycle of *Paramphistomum microbothrium*, Fiscoeder, 1901 (Trematoda, Paramphistomidae). *Parasitology* 44: 285-299.

DREYFUSS, G., RONDELAUD, D. 2008. Biodiversity of flukes. *Parasite.* 15(3): 282-285.

DURIE, P. H. 1953. The Paramphistomes (Trematoda) of Australian Ruminants. II. The life history of *Ceylonocotyle streptocoelium* (Fiscoeder) Nasmark and of *Paramphistomum ichikawai* Fukui. *Proc. Lin. Soc. N. S. W.* 76: 41–48.

DURIE, P. H. 1956. The Paramphistomes (Trematoda) of Australian Ruminants. III. The life history of *Calicophoron calicophorum* (Fiscoeder) Nasmark. *Aust. J. Zool.* 4: 152–157.

DVORIADKIN, V. A., ERMOLENKO, A. V., BESPROZVANNYKH, V. V. 1983. Biology of *Paramphistomum petrowi*, a parasite of axis deer in the Maritime Territory. *Parazitologiya* 17(4): 311-314.

EDUARDO, S. 1982a. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. I. General considerations. *Syst. Parasitol.* 4: 7-57.

EDUARDO, S. 1982b. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. II. Revision of the genus *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901. *Syst. Parasitol.* 4: 189-238.

EDUARDO, S. 1985. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. V. Revision of the genus *Cotylophoron* Fiscoeder, 1901. *Syst. Parasitol.* 7: 13-26.

FERNANDEZ, M. Experiencia de Veterinarios: Un mal ligado a las inundaciones, *Paramphistomum*. 2004. Disponible online en: <http://www.lanacion.com.ar/639150-un-mal-ligado-a-las-inundaciones.html>

FLORES, V., BRUGNI, N. 2005. *Notocotylus biomphalariae* n. sp. (Digenea: Notocotylidae) from *Biomphalaria peregrina* (Gastropoda: Pulmonata) in Patagonia, Argentina. *Syst. Parasitol.* 61 (3): 207-214.

FORLANO M., HENRÍQUEZ H., MELÉNDEZ R. 1997. Incidencia y prevalencia de *Cotylophoron* spp. (Trematoda: Digenea) en bovinos del asentamiento campesino "Las majaguas". Portuguesa - Venezuela. *Gac. Cienc. Vet.* 7:16-20.

FREYRE A. 1987. *Paramphistomum cervi* y *P. ichikawai* (Trematoda, Paramphistominae) en vacunos de Uruguay. *Rev. Soc. Urug. Parasitol.* 1:35-40.

FRIED, B., HUFFMAN, J. E., KEELER, S., PEOPLES, R. C. 2009. The Biology of the Caecal Trematode *Zygodontia schrami*. *En: ROLLINSON, D., HAY, S. I.,* (edits). *Advances in Parasitology*, Burlington, Academic Press 69 : 1-40.

FOX, N., WHITE, P., McCLEAN, C., MARION, G., EVANS, A., HUTCHINGS, M. 2011. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *Plos ONE*. 6(1) : e16126. Disponible online en <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016126>

6

GEVREY, J., BOURDOISEAU, G. 1998. Le traitement de la Paramphistomose des ruminants. *Le Point Veterinaire* 29(194) : 45-48.

GONZÁLEZ MEDINA L. 1975 .Paranfistomídeos (Trematoda) em ovinos (*Ovis aries*) do Rio Grande do Sul, Brasil. [Tesis de Maestría]. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Rio Grande Do Sul, Brasil. 34 pp.

Goswami, L.M., Prasad, P.K., Tandon, V., Chatterjee, A. 2009. Molecular characterization of *Gastrodiscoides hominis* (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea) inferred from ITS rDNA sequence analysis. *Parasitol. Res.* 104, 1485–1490.

GOWER, J. C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. 27: 857-871.

GUPTA, B. C., PARSHAD, V. R., GURAYA, S. S. 1984. Maturation of *Paramphistomum cervi* in sheep in India. *Vet. Parasitol.* 15: 239-245.

GUPTA, R. P., CHAUDHRI, S. S., RUPRAH, N. S., YADAV, C. L. 1985. Epizootiology of paramphistomiasis in Haryana state. *Indian J. Anim. Sci.* 55 (1): 14-19.

GUTIERREZ GREGORIC, D. E., NUÑEZ, V., RUMI, A., ROCHE, M. A. 2006. Freshwater gastropods from Del Plata Basin, Argentina. Checklist and new locality records. *Com. Soc. Malacol. Urug.* 9(89): 51–60.

HANNA, R. E. B., WILLIAMSON, D. S., MATTISON R. G., NIZAMI W. A. 1988. Seasonal reproduction in *Paramphistomum epiclitum* and *Gastrothylax crumenifer*, rumen paramphistomes of the Indian water buffalo, and comparison with the biliary paramphistome *Gigantocotyle explanatum*. *Int. J. Parasitol.* 18 (4): 513-521.

HAPPICH, F. A., BORAY, J. C. 1969. Quantitative diagnosis of chronic fascioliasis. 2. The estimation of daily total eggs production of *Fasciola hepatica* and the number of adult flukes in sheep by faecal egg counts. *Aust. Vet. J.* 45: 329 – 331.

HERD, R. P., HULL, B. L. 1981. *Paramphistomum microbothrioides* in American bison and domestic beef cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179(10):1019-1020.

HIJMANS, R., CAMERON, S., PARRA, J., JONES, P., JARVIS, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climat.* 25:1965-1978.

HORAK, I. G. 1962a. Studies on paramphistomosis part IV: modified critical and controlled antihelmintic tests on the conical fluke *Paramphistomum microbothrium*. *J. S. Afr. Med. Vet. Assoc.* 23(2): 203-208.

HORAK, I. G. 1962b. Studies on Paramphistomiasis III: a method of testing the viability of paramphistome metacercariae. *J. Vet. Res.* 29: 197–202.

HORAK, I. G. 1965. The antihelmintic efficacy of bithionol against *Paramphistomum microbothrium*, *Fasciola* sp and *Schistosoma mattheei*. *J. S. Afr. Med. Vet. Assoc.* 36 (4): 561-566.

HORAK, I. G. 1965. Studies on paramphistomiasis. VII. The immunisation of sheep, goats and cattle. Preliminary report. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 36 (3): 361-363.

HORAK, I. G. 1967. Host – Parasite relationships of *Paramphistomum microbothrium* (Fischoeder, 1901), in experimentally infested ruminants, with particular reference to sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 34: 451–540.

HORAK, I. G. 1971. Paramphistomiasis of domestic ruminants. *En Advances in Parasitology*. Academic Press. London: 33–72.

HORAK, I. G., SNIJDERS, A. J., LOUW, J. P. 1972. Trials with rafoxanide. Efficacy studies against *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Paramphistomum microbothium* and various nematodes in sheep. *J. S. Afr. Med. Vet. Assoc.* 43 (4): 397-403.

ICHIKAWA, M., ITAGAKI, T. 2010. Discrimination of the ITS1 types of *Fasciola* spp. based on a PCR–RFLP method. *Parasitol. Res.* 106: 757-761.

ITAGAKI, T., TSUMAGARI, N., TSUTSUMI, K., CHINONE, S. 2003. Discrimination of three amphistome species by PCR-RFLP based on rDNA ITS2 markers. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 931-933.

KHAN, U. J., TANVEER, A., MAQBOOL, A., MASOOD, S. 2008. Epidemiological studies of Paramphistomosis in cattle. *Vet. Arhiv.* 78(3): 243-251.

KRULL, W. H. 1934. Life history studies on *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901), Stiles and Goldberg, 1910. *J. Parasitol.* 20(3): 173-180.

KUSUKAWA, N. R., UEMORI, K., ASACA, I., KATO, I. 1990. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain

reaction. *BioTechniques* 9: 66-72.

LAHILLE, F., JOAN, T. 1917. Nota preliminar sobre un nuevo género de trematodes. *Physis* 3: 216– 219.

LENGY, J. 1960. Study on *Paramphistomum microbothrium* Fiscoeder 1901 a rumen parasite of cattle in Israel. *Bull. Res. Coun. Israel.* 9B: 71–130.

LOISELLE, B. A., HOWELL, C. A., GRAHAM, C. H., GOERCK, J. M., BROOKS, T., SMITH, K. G., WILLIAMS, P.H. 2003. Avoiding pitfalls of using species distribution models in conservation planning. *Conservation Biology* 17: 1591-1600.

LOPEZ, L. P., ROMERO, J., VELÁSQUEZ, L. E. 2008. Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja del trópico alto en el occidente de Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 21: 9-18.

MAGE, C., BOURGNE, H., TOULLIEU, J. M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G. 2002. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.* 33 (5): 439-447.

MELHORN, H. 2001. Encyclopedic reference of parasitology. 2nd edition. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 678 pp.

MIRANDA, M. A., COSTA, H. M. A. 1999. Report and description of some species of *Cotylophoron* (Trematoda: Paramphistomidae) in domestic ruminants of Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 8(1): 1-15.

MÜLLER, G., LARA, S. I. M., RIBEIRO, P. B. 1992. Infecção natural e experimental de *Drepanotrema kermatoides* (Planorbidae) com *Paramphistomum* sp. (Fischöeder, 1901) no Rio Grande Do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 1(1): 23-26.

NARI, A., CARDOZO, H., SOLARI, M. A., PETRACCIA, C., ACOSTA, D. 1986. Estudio preliminar sobre el desarrollo de *Lymnaea viatrix* D'Orbigny (1835) en condiciones controladas de temperatura y humedad. *Veterinaria.* 22 (95): 13-17.

OIE. Chapter 7.5: Slaughter of animales Terrestrial animal health code. 2008. http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2008/en_chapitre_1.7.5.htm

OSTROWSKI DE NUÑEZ, M. 1979. Fauna de agua dulce de la República Argentina. IX. Sobre representantes de la familia Paramphistomatidae (Trematoda). *Physis* 38(95): 55-62.

OSTROWSKI DE NUÑEZ, M., SPATZ, L., GONZALEZ CAPPA, S .M. 2003. New intermediate hosts in the life cycle of *Zygocotyle lunata* in South America. *J. Parasitol.* 89: 193–194.

OVER, H. J., JANSEN, J., VAN OLM, P. W. 1992. Distribution and impact of helminth diseases of livestock in developing countries. *FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER*; FAO, Rome, Italy. 96 pp.

PAIVA, N. 1994. Epidemiología y control de *Paramphistomum* en Uruguay. *En* Nari, A., Fiel, C. (Eds): Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Hemisferio Sur, Montevideo Uruguay: 257-264.

PARAUD, C., GAUDIN, C., PORS, I., CHARTIER, C. 2009. Efficacy of Oxiclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. *Vet. J.* 180(2): 265-267.

PARK, G. M., LEE, K. J., IM, K. I., PARK, H., YONG T. S. 2001. Occurrence of diploid type and a new first intermediate host of a human lung fluke, *Paragonimus westermani*, in Korea. *Exp. Parasitol.* 99: 206-212.

PINO, L., MORALES, G. 1982. *Lymnaea cubensis*, Pfeiffer 1839 hospedador intermediario de *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901) Stiles and Goldberg, 1910, en condiciones naturales. *Acta Cient. Venez.* 33: 57-60.

PRESTWOOD, A. K., FOREST, E., KELLOGG, F. E. 1975. Helminth parasitisms among intermingling insular populations of white tailed deer, feral cattle and feral swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 168(8): 787-789.

RACCIOPPI, O., LOMBARDERO, O., MORIENA, R. 1994. *Cotylophoron*

cotylophorum (Fischoeder, 1901) (Trematoda, Paramphistomidae) nuevo parásito del bovino en Argentina. *Rev. Med. Vet.* 75: 228 – 229.

RANGEL RUIZ, L. J., ALBORES-BRAHMS S.T., GAMBOA AGUILAR, J. 2003. Seasonal trends of *Paramphistomum cervi* in Tabasco, Mexico. *Vet. Parasitol.* 116: 217-222.

RIMBAUD, E., DIANA, V. 1991. Descripción de un cuadro de mortandad en bovinos asociado a Paramphistomiasis. *Vet. Argent.* 8: 606–612.

RIMBAUD, F., LORENZO, P. 1995. Estudio de la funcionalidad reticulo- rumen en bovinos parasitados con *Paramphistomum* spp. *Vet. Argent.* 12(122): 98-102.

RINALDI, L., PERUGINI, A. G., CAPUANO, F., FENIZIA, D., MUSELLA, V., VENEZIANO, V., CRINGOLI, G. 2005. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 131: 247-253.

ROCHA-CALVACANTE, A. C., SANTA-ROSA, J., DA SILVA-VIEIRA, L., RIZALDO-PINHEIRO, R. 2000. Infecção por Paramphistomidae em caprinos na microrregião homogênea de Sobral, CE. *R. Bras. Med. Vet.* 22(6): 255-257.

RODRIGUEZ ARMESTO, R., BONNO BATTISTONI, M. F., PERALTA, J. L. 2002. *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901): su presencia en bovinos del nordeste de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Vet. Argent.* 19: 290-292.

ROLFE P. F., BORAY, J. C. 1987a. Chemotherapy of paramphistomosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 64: 328-332.

ROLFE, P. F., BORAY, J. C. 1987b. Chemoterapy of paramphistomosis in sheep. *Aust. Vet. J.* 65: 148–150.

ROLFE, P. F., BORAY, J. C., NICHOLS, P., COLLINS, G. H. 1991. Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 21: 813–819.

ROLFE, P. F., BORAY, J. C. 1993. Comparative efficacy of moxidectin, an ivermectin/clorsulon combination and closantel against immature paramphistomes in cattle. *Aust. Vet. J.* 70(7): 265-266.

ROLFE, P. F., BORAY, J. C., COLLINS G. H. 1994. Pathology of infection with *Paramphistomum ichikawai* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24(7): 995-1004.

RONDELAUD, D., ABORUS, M., DREYFUSS, G. 2002. The influence of different food sources on cercarial production in *Lymnaea truncatula* experimentally infected with Digenea. *Vet. Res.* 33(1): 95-99.

RUMI, A., TASSARA, M., BONETTO, A. 1997. Distribución de las especies de

Planorbidae en Argentina y su relación con el riesgo de esquistosomiasis. *Ecosur* 17: 1–19.

RUMI, A., GUTIERREZ GREGORIC, D. E., ROCHE, M. A. 2007. Growth rate fitting using the von Bertalanffy model: analysis of natural populations of *Drepanotrema* spp. snails (Gastropoda: Planorbidae). *Rev. Biol. Trop.* 55 (2): 559-567.

SANABRIA, R., ROMERO, J. 2008. Review and update of Paramphistomosis. *Helminthologia* 45(2): 64-68.

SANABRIA R, MARTORELLI S., ROMERO J. 2009. First report of *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 (Trematoda: Paramphistomidae) in Argentina, and re-examination of *Cotylophoron cotylophorum sensu* Racioppi et al. (1994). *Helminthologia*. 46 (4) : 225-229.

SANABRIA, R., MORÉ, G., ROMERO, J. 2011. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). *Vet. Parasitol.* 177(1-2): 182-185.

SANCHEZ, R., SANABRIA, R., ROMERO, J. 2005. Hallazgo de *Cotylophoron cotylophorum* (Fischöeder, 1901) en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. *Vet. Argent.* 19: 290-292.

SCHIFFO, H., LOMBARDERO, O. 1974. Mortandad en vacunos producida por

Balanorchis anastrophus. *Gac. Vet.* 36: 139–146.

SEMYENOVA, S. K., MOROZOVA, E. V., VASILYEV, V. A., GOROKHOV, V. V., MOSKVIN, A. S., MOVSESSYAN, S. O., RYSKOV, A. P. 2005. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Parasitol.* 50(3): 240–243.

SEY, O. 1974. On the species of *Paramphistomum* in cattle and sheep in Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 24(1): 19-37.

SEY, O. 1989. A review of chemotherapy of paramphistomosis of domestic ruminants in Europe. *Parasit. Hung.* 22: 51-55.

SEY, O. 1991. CRC Handbook of the Zoology of Amphistomes. CRC press Inc. Boca Ratón, Florida. 480 pp.

SILVA SANTOS I., LARANJA R, MARTINS J., CERESÉR V. 1986. Hospedeiro Intermediario do *Paramphistomum* (Fischoeder, 1901), *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835), Guaíba, R S – Brasil. *Bol IPVDF, Guaíba.* 1-122: 19-25.

SILVESTRE, A., SAUVÉ, C., CABARET, J. 2000. Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Vet. Rec.* 146: 674-675.

SINCLAIR, K. B. 1969. Some aspects of the pathogenesis and treatment of fascioliasis. *Vet. Rec.* 84: 544-547.

SINGH, C. D. N., LAKRA, P. 1971. Pathologic changes in naturally occurring *Cotylophoron cotylophorum* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 32(4): 659-663.

SINGLA, L. D., KAUR, A., SANDHU, V. S., CHOWDHURY, N. 1998. Experimental Infection of amphistome metacercariae (*Paramphistomum cervi*) in rabbit. A preliminary study. *Indian Vet. J.* 75: 690-692.

SPENCE S. A., FRASER G. C., CHANG S. 1996. Responses in milk production to the control of gastrointestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Aust. Vet. J.* 74(6): 456-459.

SRIVASTAVA, H. D. 1938. A study of the life history and pathogenicity of *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901), Stiles and Goldberg, 1910, of Indian ruminants and a biological control to check the infestation. *J. Vet. Sci.* 8: 381.

SZIDAT L., OSTROWSKI DE NUÑEZ, M. 1962. Un trematode del estómago de rumiantes sudamericanos, *Balanorchis anastrophus* como cazador y predador. *Neotropica* 8: 93-99.

TONETTO, C. J., LOVATO FLORES, M., CORREA BARBOSA, T. M, ALBURQUERQUE LAGAGGIO, V. R., NOAL, S. A., GAI, T. 2001. Casuística

de *Paramphistomum* sp (Fischoeder, 1901) em ruminantes – uma revisao. *R. Bras. Med. Vet.* 23(6):250-256.

UENO H., GONÇALVES, P. C. 1988. Manual de laboratorio para el diagnostico de helmintos en ruminantes. 2° ed. Japan International Cooperation Agency Tokyo, Japan. 166 pp.

VARMA, A. K. 1961. Observations on the biology and pathogenicity of *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901). *J. Helminthol.* 35(1-2): 161-168.

VENTURINI, L. 1990. El ciclo de *Fasciola hepatica* Linneo 1758 en *Lymnaea viatrix* d'Orbigny 1835: su duración y las formas juveniles presentes con temperatura de verano. *Vet. Argent.* 7 (62): 84-90.

VIDIGAL, T., CALDEIRA, R .L, SIMPSON, A. J. G., CARVALHO, O. S. 2000. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 95: 57-66.

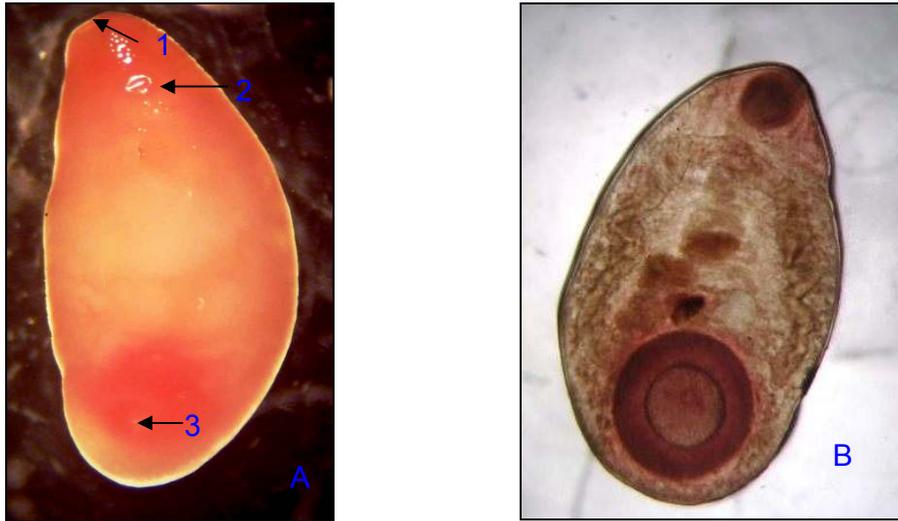
WARD, D. F. 2007. Modelling the potential geographic distribution of invasive ant species in New Zealand. *Biol. Invasions* 9:723-735.

WILLEY, C. H. 1941. The life history and bionomics of the trematode, *Zygocotyle lunata* (Paramphistomidae). *Zoologica* 26: 65–92.

ZAVODNA M., SANDLAND G. J., MINCHELLA D. J. 2008. Effects of intermediate host genetic background on parasite transmission dynamics: a case study using *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 120(1):57-61.

APENDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Ejemplar adulto fresco de *Paramphistomum* sp. obtenido del rumen de bovinos. B. Ejemplar fresco comprimido, obtenido del rumen de ovinos, en estado aún inmaduro, ya que no presenta huevos en su útero. Foto original.



Referencias: 1.: ventosa oral; 2.: poro genital; 3.: acetábulo.

Figura 2: Ejemplar de *Balanorchis anastrophus* fijado. Foto original.



1: ventosa oral; 2: bolsa del cirro protruyendo. 3: acetábulo.

Figura 3. Cercarias amphistomas. Izquierda: cercaria similar a la descrita por Ostrowski de Nuñez (1979), como *Catadiscus uruguayensis*; Derecha: cercaria de *Paramphistomum leydeni*. Foto original.

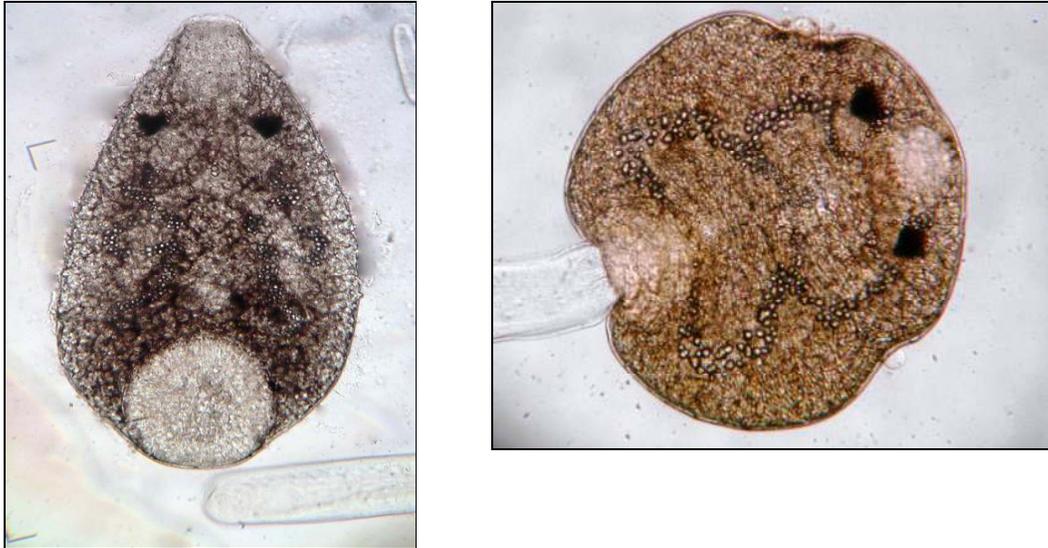


Figura 4. Dos ejemplares de *P. leydeni*, recolectados recientemente del rumen, uno de ellos elongado para adherir la ventosa oral. Foto original.



Figura 5. Huevos de *F. hepatica* (izquierda), y *Paramphistomum* sp. (derecha), mediante la técnica de filtración y sedimentación. Foto original.

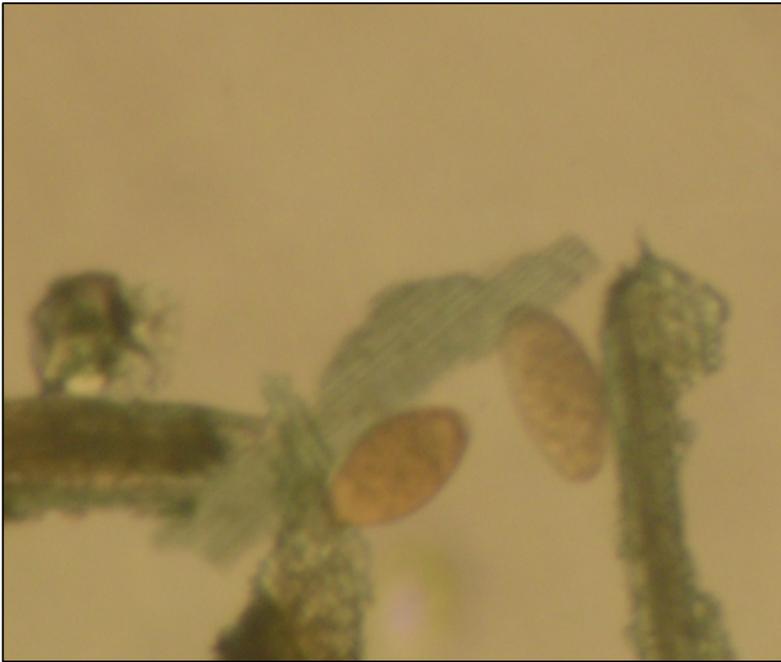


Figura 6. Ejemplares de *P. leydeni* recuperados de intestino delgado (izquierda) y adulto de rumen (derecha). Foto original.

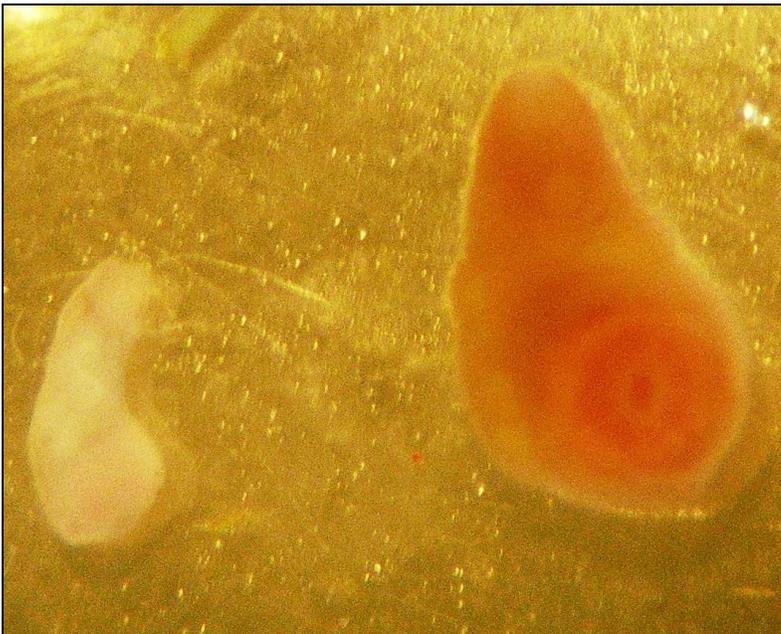
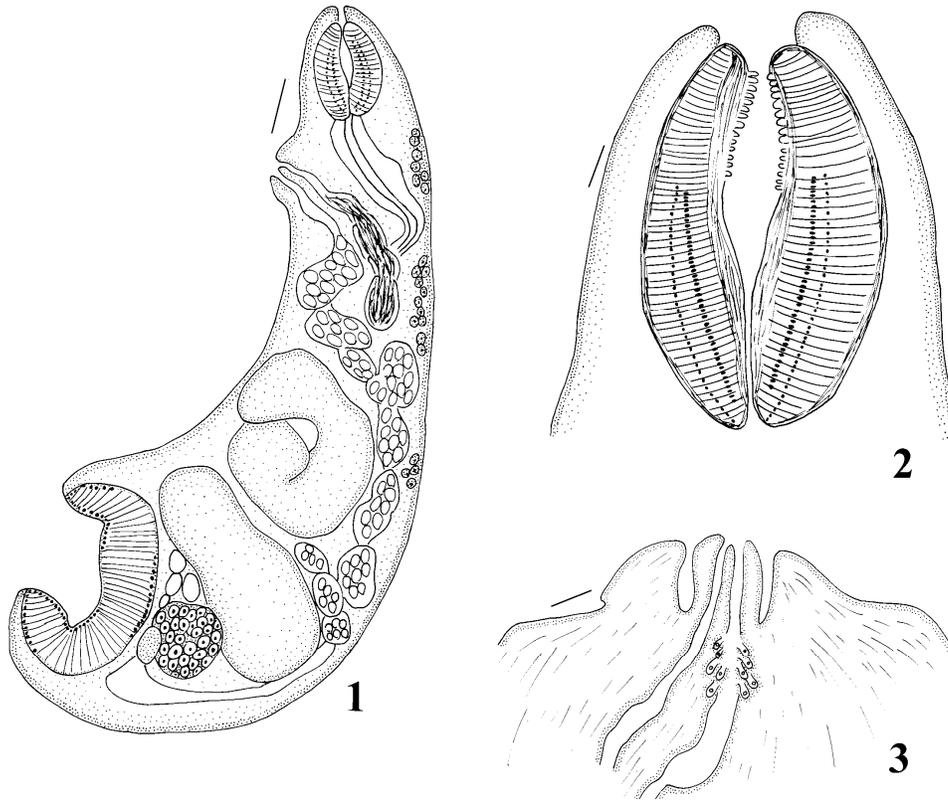
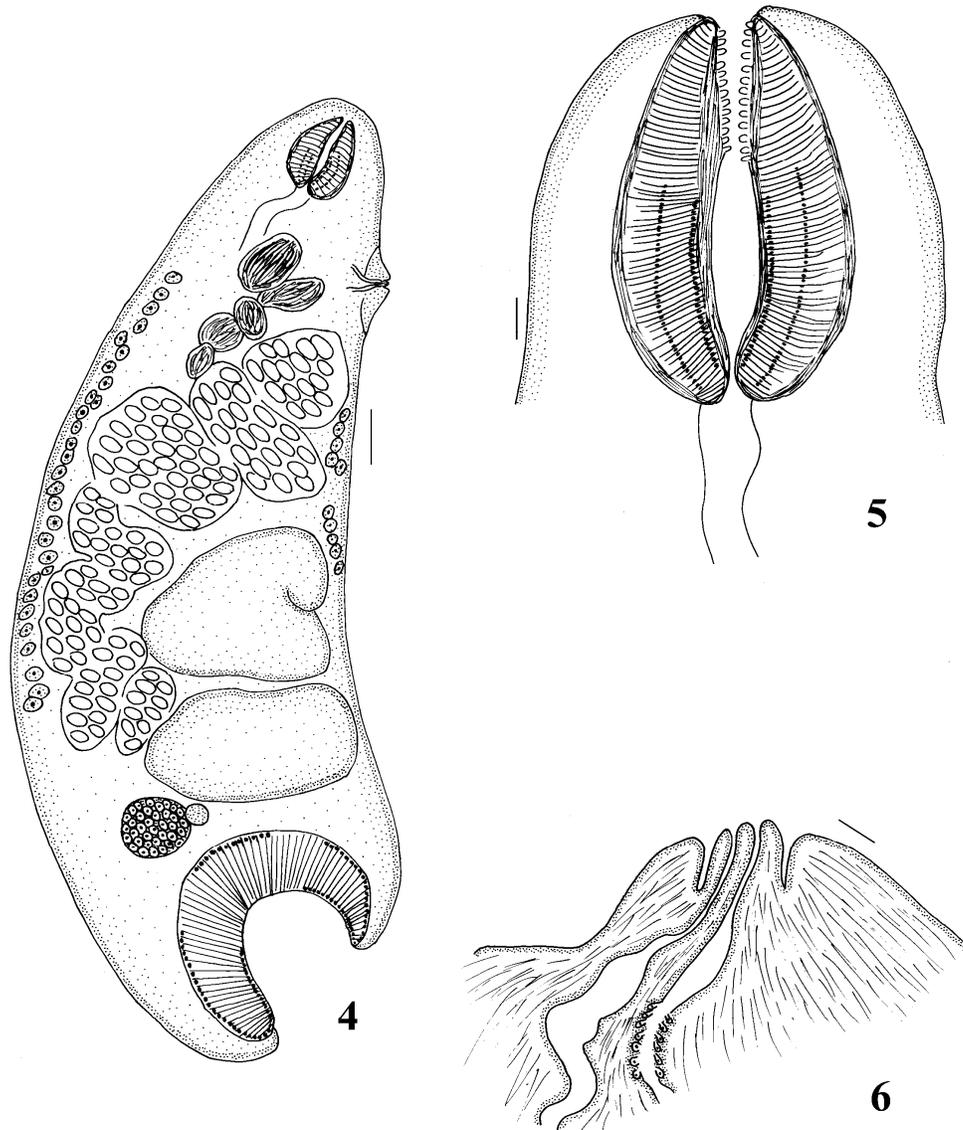


Figura 7. *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes.



1: Corte sagital, escala = 500 μm . 2: Faringe, escala=100 μm 3: Terminal genitalium y pars prostatica, escala =100 μm

Figura 8. *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Buenos Aires.



4: corte sagital, escala=500 μm . 5: Faringe, escala= 100 μm . 6: Terminal genitalium y pars prostatica, escala=100 μm .

Figura 9. *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. Sección sagital del acetábulo. H&E, escala=500 μ m

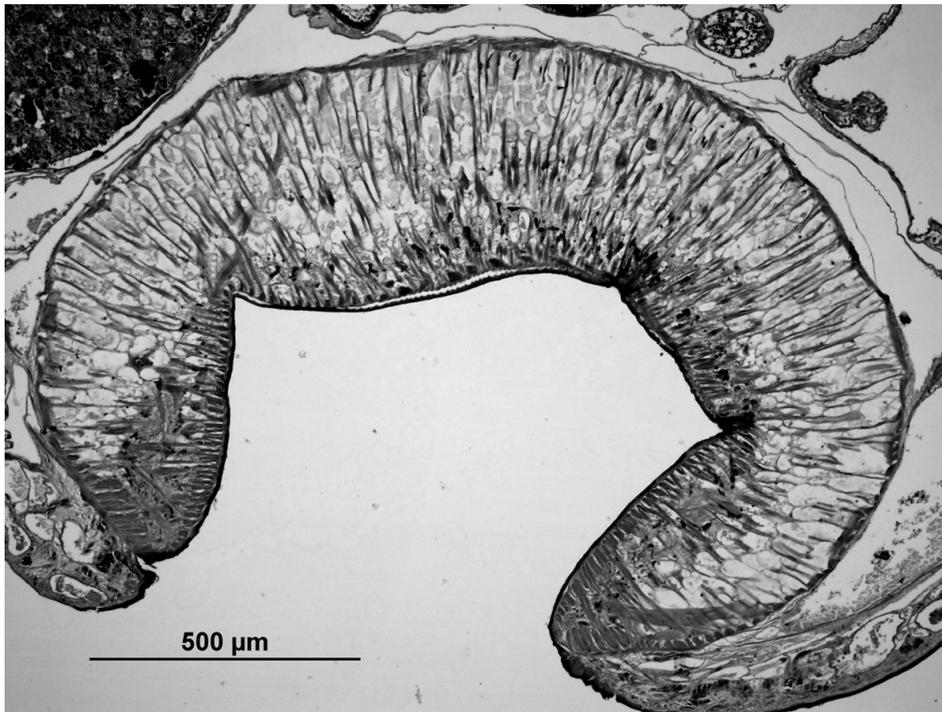


Figura 10. *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. Faringe y Esófago, sección sagital. H&E, escala=500 μ m

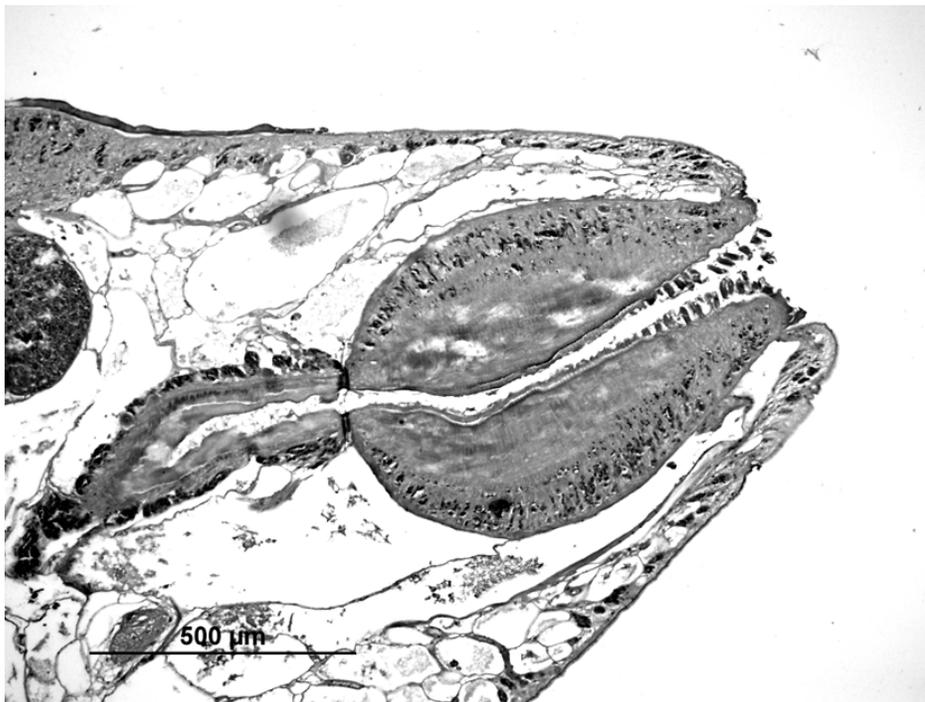


Figura 11. *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 de Corrientes. Terminal genitalium, sección sagital. H&E, escala= 500 μ m.

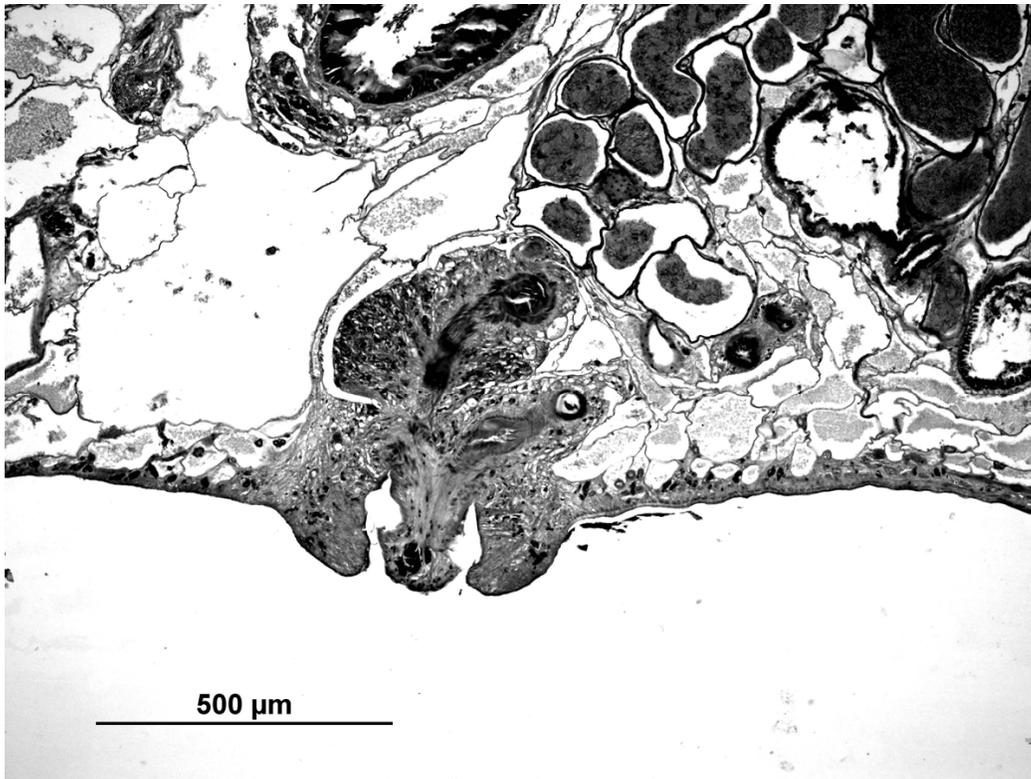


Figura 12. Patrones de restricción del ITS-2+ de *P. leydeni* mediante la enzima *HhaI*. De izquierda a derecha: *P. leydeni*, cercarias Notocotylidae y huevos de *F. hepatica* (1, 2, 3), fragmentos de restricción de *P. leydeni* de bovinos (4, 5, 6, 7), y ovinos (8, 9), Notocotylidae (10) y *F. hepatica* (11) L: 100 bp ladder. Las flechas blancas muestran el tamaño aproximado de los fragmentos.

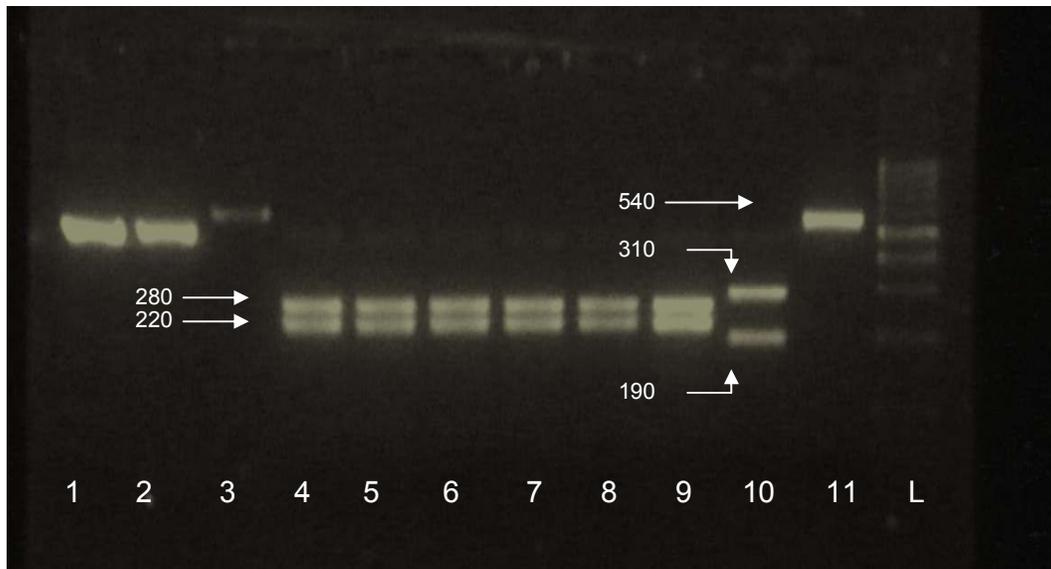


Figura 13. Patrones de restricción del ITS-2+ de *P. leydeni* mediante la enzima *Hinfl*. De izquierda a derecha: *P. leydeni*, cercarias Notocotylidae y huevos de *F. hepatica* (1, 2, 3), fragmentos de restricción de *P. leydeni* de bovinos (4, 5, 6, 7), y ovinos (8, 9), Notocotylidae (10) y *F. hepatica* (11) L: 100 bp ladder. Las flechas blancas muestran el tamaño aproximado de los fragmentos.

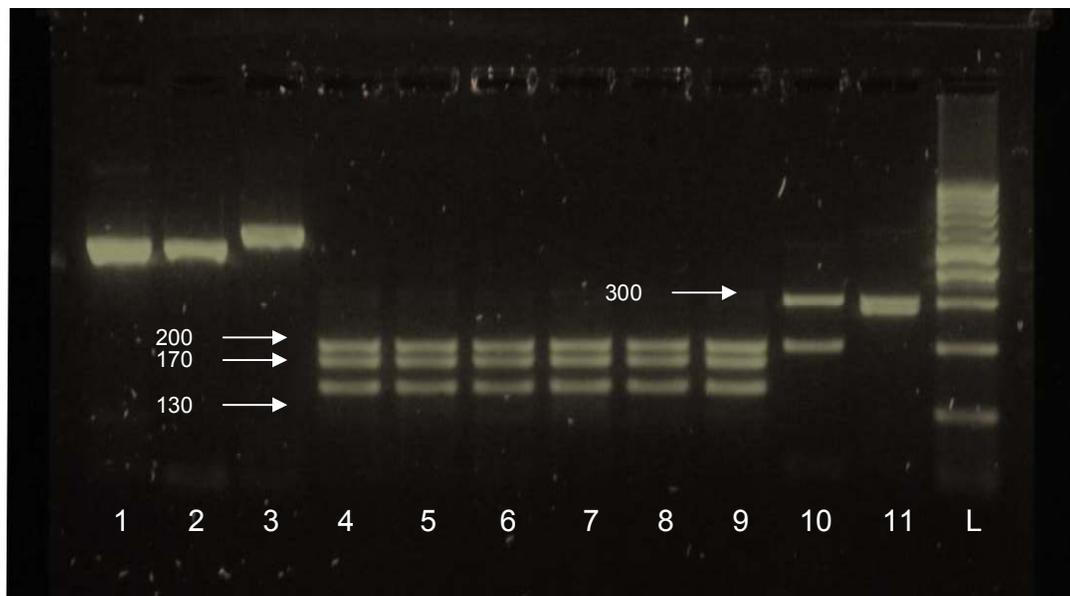


Figura 14. Secuencia consenso de *P. leydeni* ITS-2 (caracteres subrayados) y segmentos linderos 5.8S rDNA (bases 1-107) y 28S rDNA (bases 390-441).

1	CAACTGTGTGAATTAATGTGAACTGCATACTGCTTTGAACATCGACATCT	50
51	TGAACGCACATTGCGGCCACGGGTTTTCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGG	100
101	GTCGGCTTATAAACTATCACGACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGAAATCTG	150
151	<u>CCAGCTGGCGTGATCTCCTCTGTGGTTCGCCACGTGAGGTGCCAGATCTA</u>	200
201	<u>TGGCGTTTTCTAATGTCTCCGGACACAACCGCGTCTTGCTGGTAGCGCA</u>	250
251	<u>GACGAGGGTGTGGCGGTAGAGTCGTGGCTCAGTTAACTGTAATGGCAGCA</u>	300
301	<u>CGCTCTACTGTTGTGCCTTTGTTAGTGTAACCTGGTTTGAGATGCTATTGC</u>	350
351	<u>TGTCCGTCCGATCATGATCACCTACTGTGGTGTCTGCTACCTGACCTCG</u>	400
401	GATCAGACGTGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAA	441

Figura 15. Distribución probable de los paramphistomidos de rumiantes mediante el modelado por BIOCLIM.

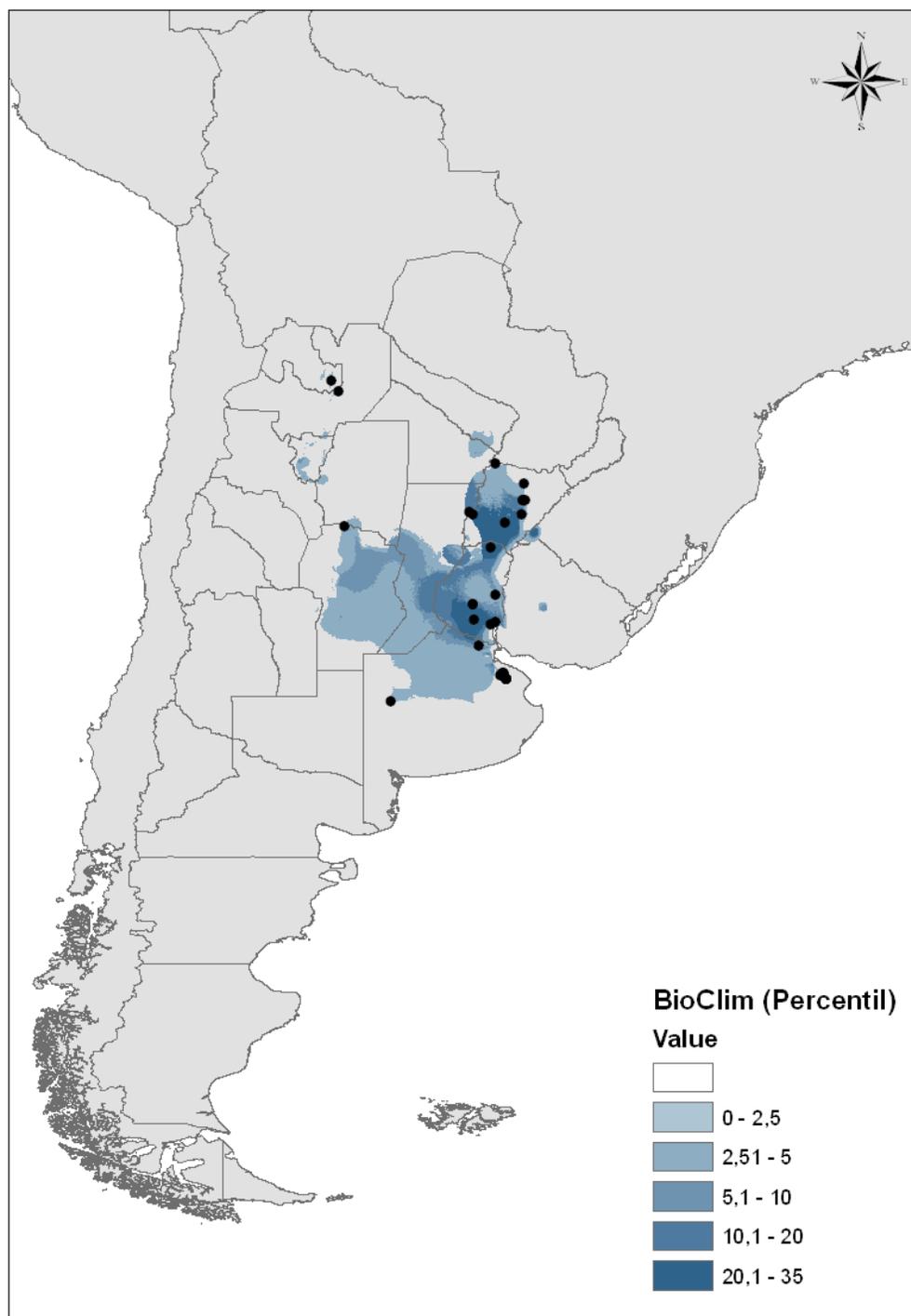


Figura 16. Distribución probable de los paramphistomidos mediante el modelado por DOMAIN.

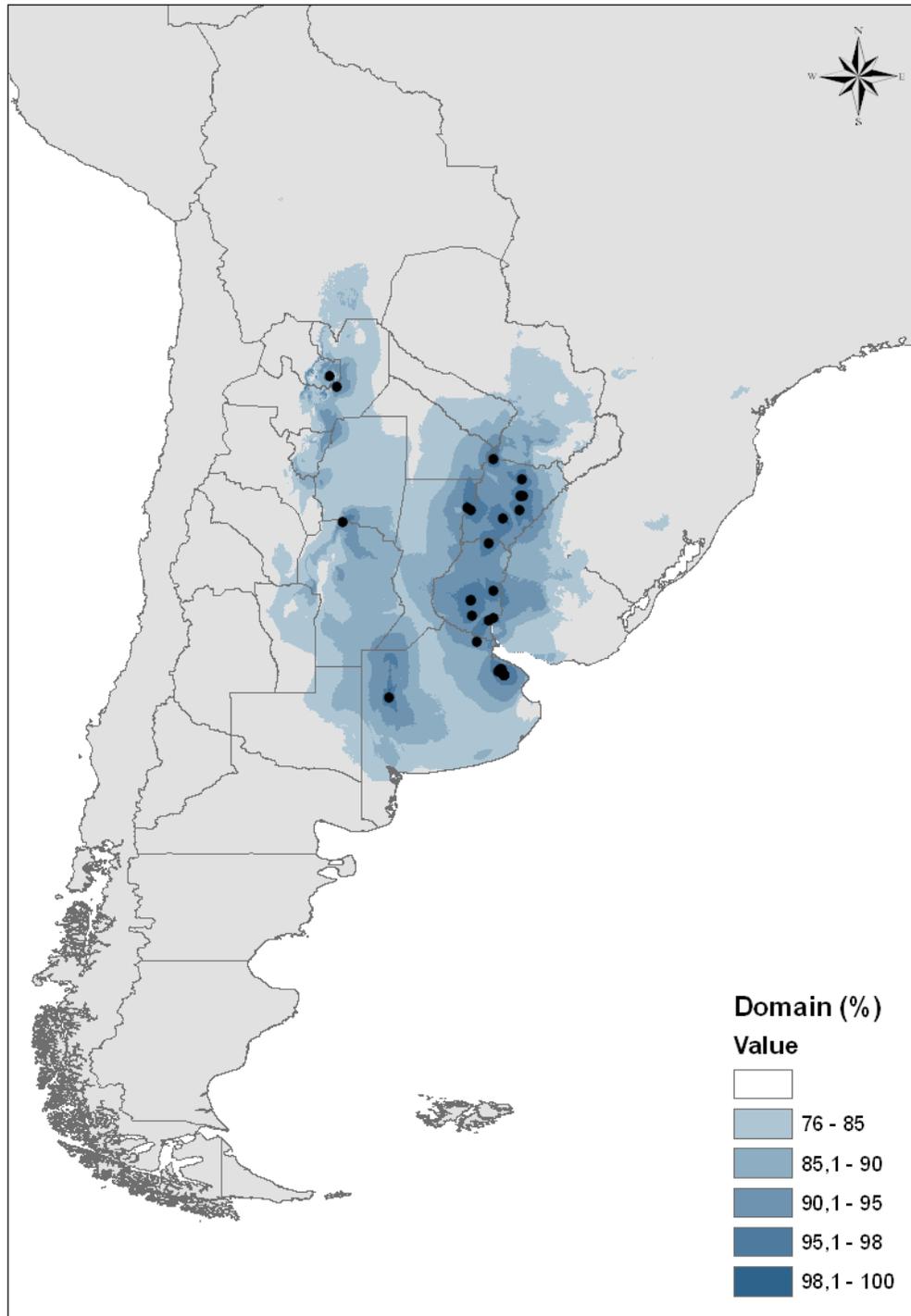


Figura 17. Variables climáticas limitantes detectadas para el desarrollo de los paramphistómidos, mediante el modelo BIOCLIM.

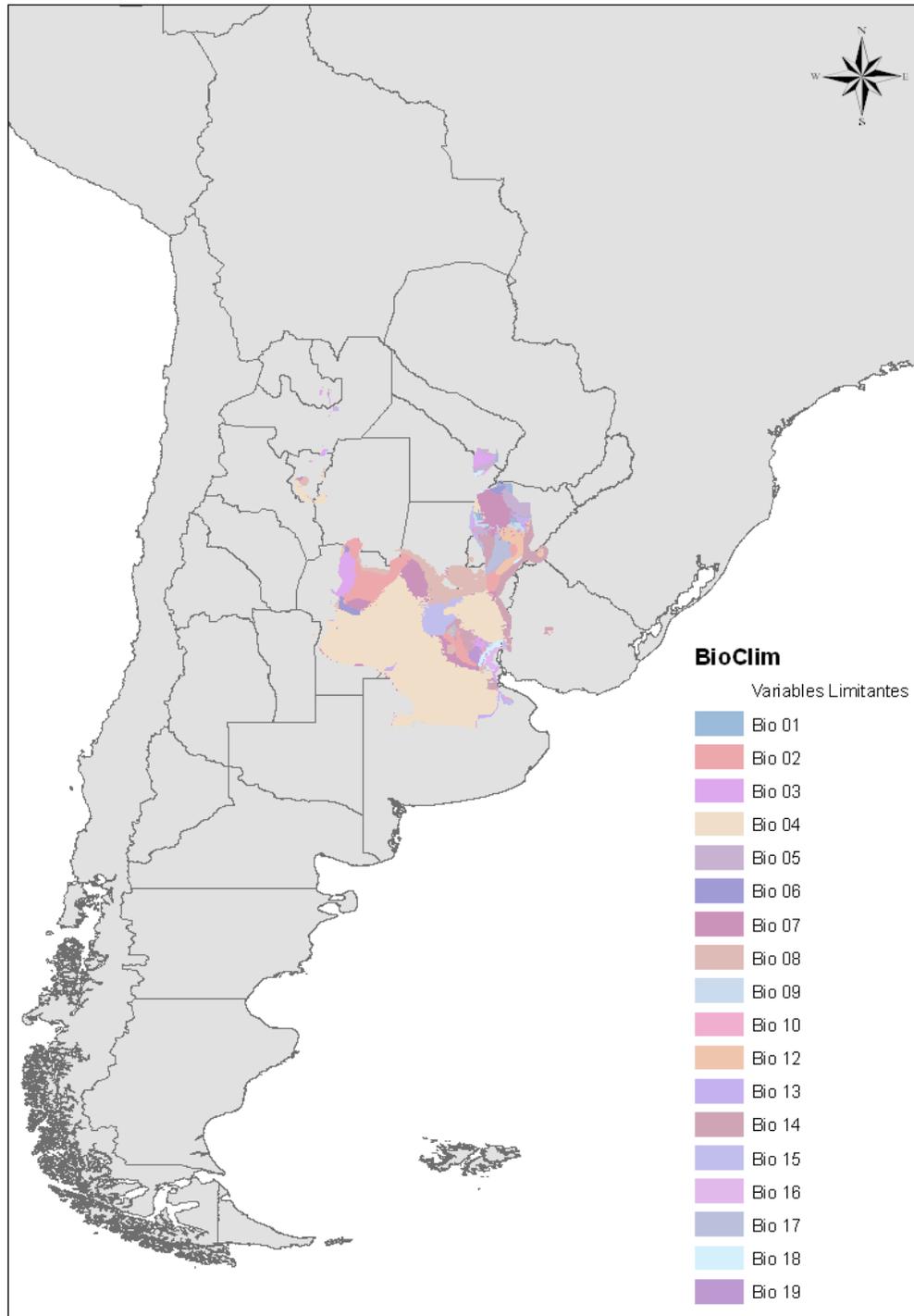


Figura 18. Variables climáticas limitantes detectadas para el desarrollo de los paramphistómidos, mediante el modelo DOMAIN.

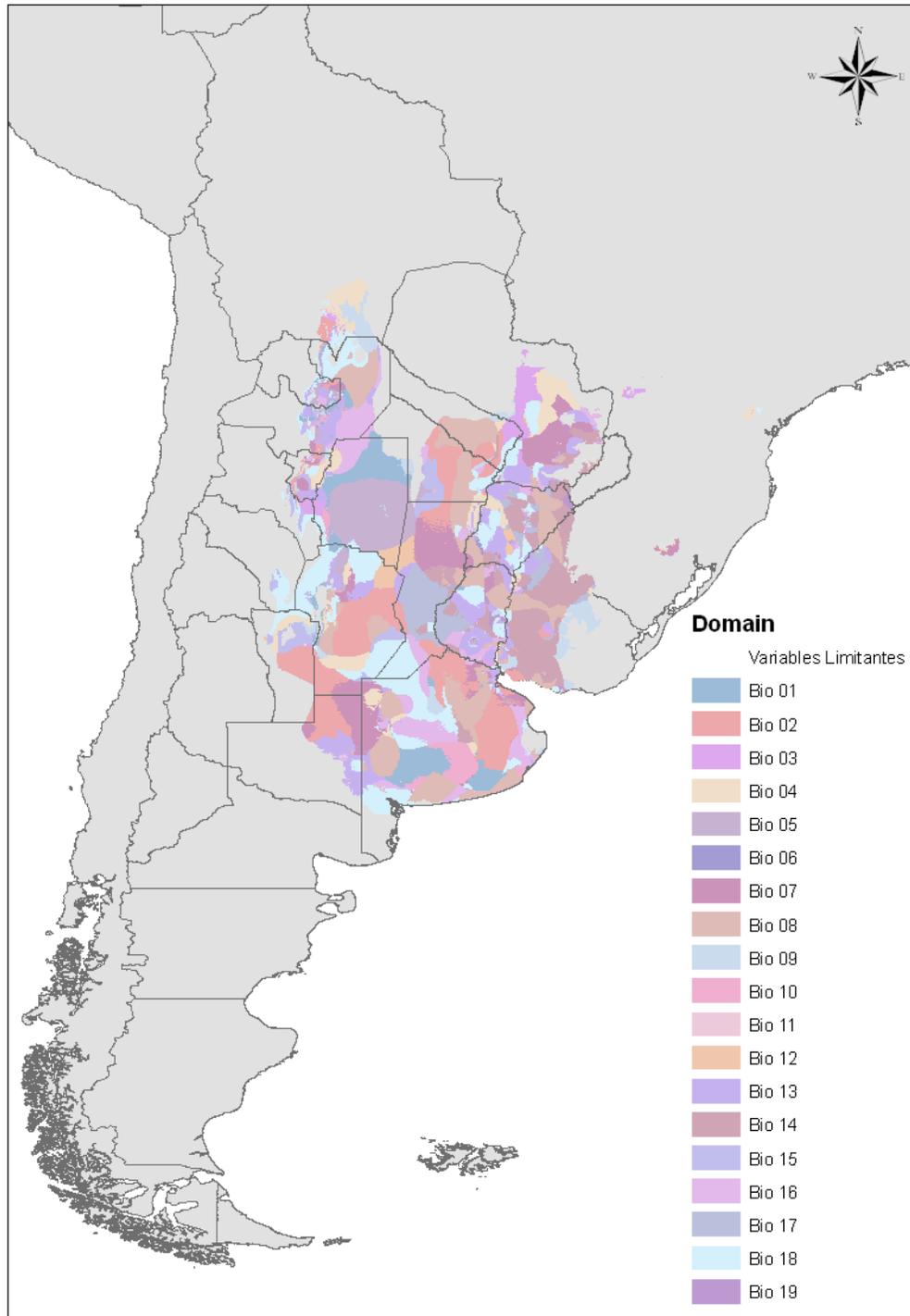


Figura 19. Fotografía satelital del arroyo Clé (flechas blancas) y espejos de agua (flechas negras) en potreros lindantes al mismo (hacia la derecha del arroyo), de donde se recolectaron los caracoles (Imagen de Google Earth®).



Figura 20. De izquierda a derecha: cercarias de *Paramphistomum*, Notocotylidae y Furcocercarias halladas en *D. depressissimum*. Fotos originales.



Figura 21. De izquierda a derecha: cercarias de *Paramphistomum* y *F. hepatica*, halladas en *L. viatrix*, y echinocercarias halladas en *B. peregrina*. Fotos originales.



Figura 22. Eclosión de huevos de *P. leydeni* a 25°C

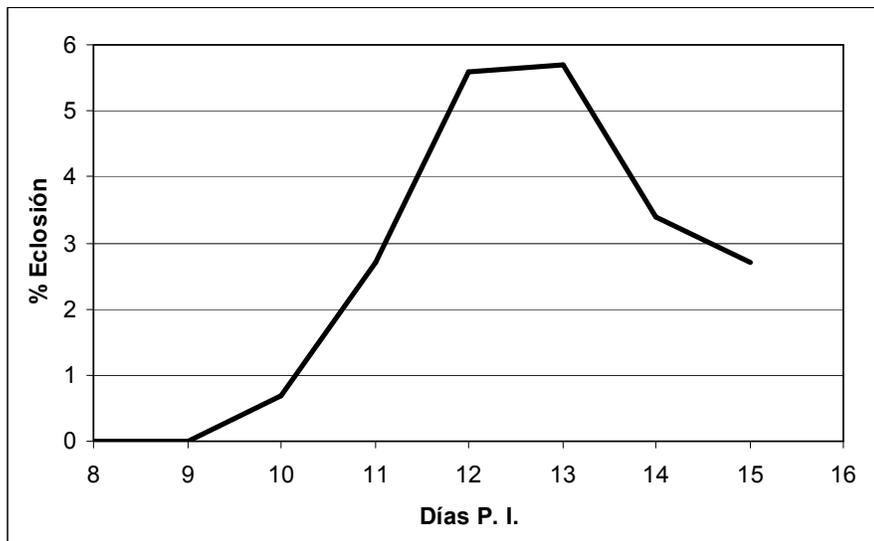


Figura 23. Ejemplares de *Paramphistomum leydeni* de ovinos infectados experimentalmente, recuperados del rumen (izquierda), y los mismos comprimidos y observados bajo lupa estereoscópica (derecha), sin desarrollo de huevos en su interior. Fotos originales.



Figura 24. Patrones de restricción del ITS-2+ de distintos estadios de *P. leydeni* mediante la enzima *HhaI*. De izquierda a derecha: 50 bp ladder (L), *P. leydeni* adultos recuperados de infestaciones naturales (1), adultos de infestación experimental con cercarias de *D. depressissimum* (2), cercarias obtenidas en *L. viatrix* (3), y huevos (4), fragmentos correspondientes a la digestión enzimática de los mismos (5, 6, 7 y 8, respectivamente), y control negativo (9). Junto a las bandas se encuentra el tamaño aproximado de los fragmentos.

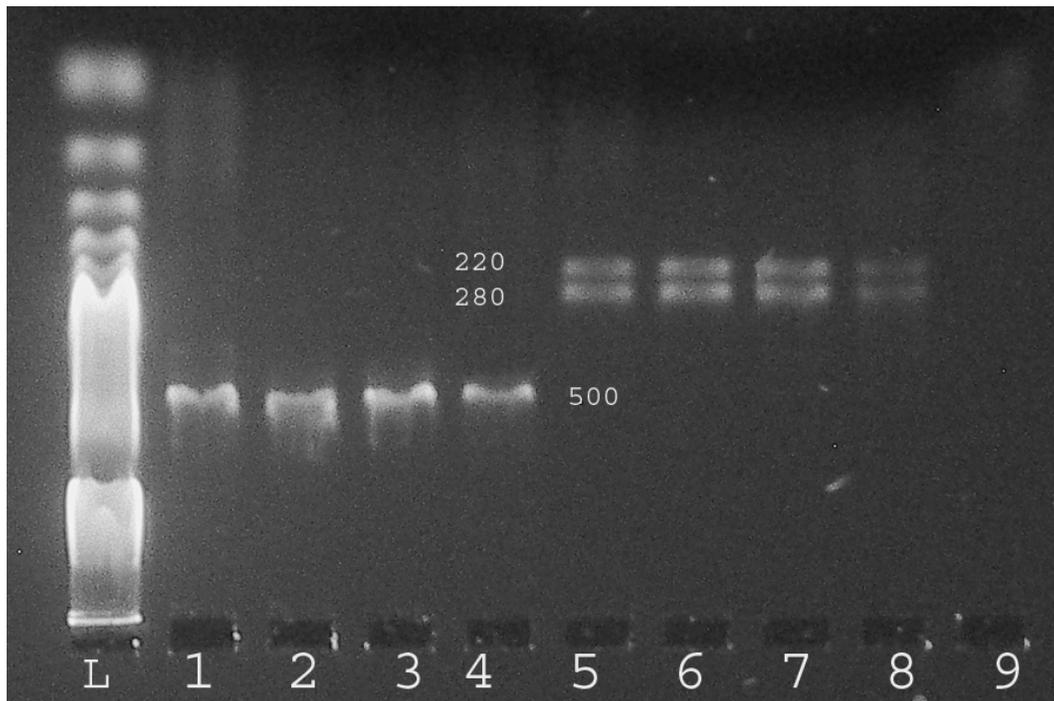


Figura 25. Patrones de restricción del ITS-2+ de distintos estadios de *P. leydeni* mediante la enzima *Hinf*I. De izquierda a derecha: 50 bp ladder (L), *P. leydeni* adultos recuperados de infestaciones naturales (1), adultos de infestación experimental con cercarias de *D. depressissimum* (2), cercarias obtenidas en *L. viatrix* (3), y huevos (4), fragmentos correspondientes a la digestión enzimática de los mismos (5, 6, 7 y 8, respectivamente), y control negativo (9). Junto a las bandas se encuentra el tamaño aproximado de los fragmentos.

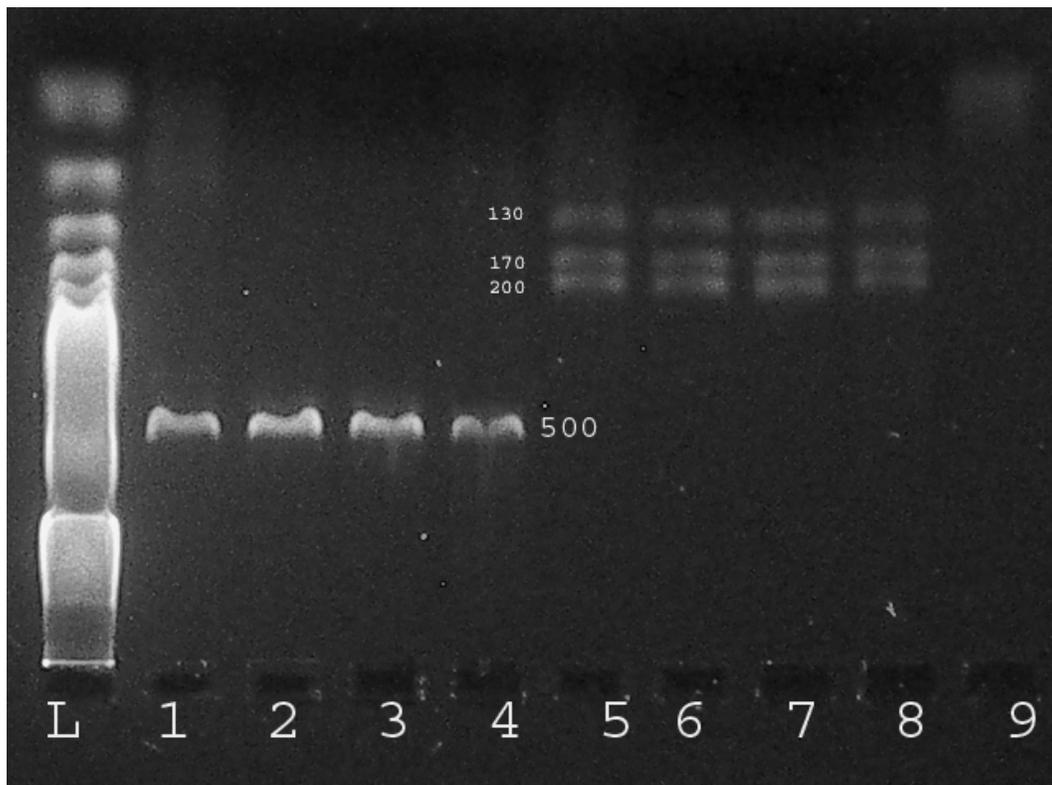


Fig. 26. Patrones de restricción del ITS-1+ de los HI de *P. leydeni* mediante la enzima *HpyF3I*. De izquierda a derecha: 100 bp ladder (L), amplificados sin cortar de *L. viatrix* cepa U (1), cepa SP (2) y *D. depressissimum* (3), productos de digestión de cada uno de los caracoles (4, 5 y 6) respectivamente, y control negativo (7). Junto a cada banda se halla el tamaño de los fragmentos.

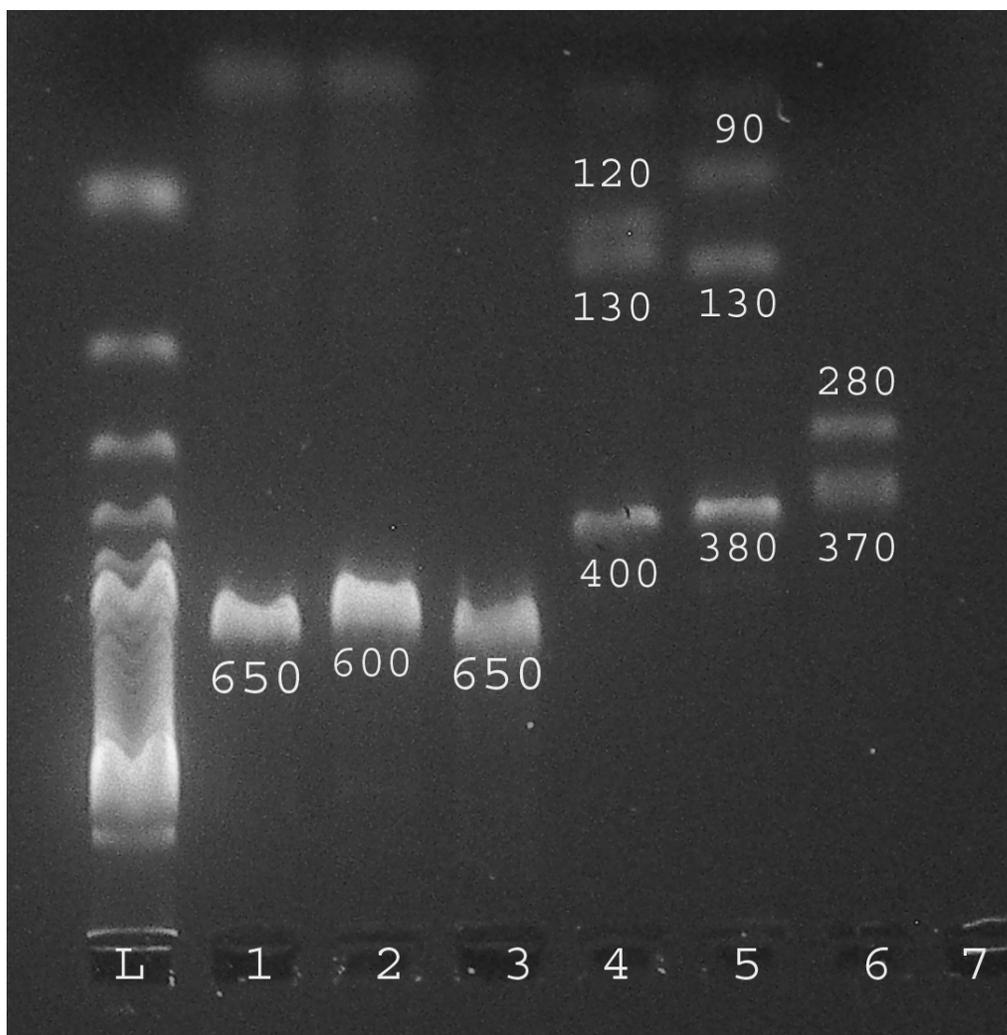


Figura 27. Comparación entre la secuencia consenso para el ITS1 de *L.viatrix* cepa U, y las descritas previamente para *L.viatrix ventricosa* (GenBank accession number AM4122227), y *L. viatrix* (GenBank accession number HQ283254).

Lv U	1	ATCATTAAACGAGTAGCAACACAACATAACCTTACACTCGCACAAAGTGTGTTTGTATTTA	60
AM4122227	1	60
HQ283254	118	177
Lv U	61	GTTGGTTGTCACAGTCACTCAGTCAGTCGGTGAAGCTTATTGGCCCCGCGGCAGGCACGC	120
AM4122227	61	120
HQ283254	178	237
Lv U	121	ATGAAGCGCTGTCGACAGCGGGGCTGTGTACGTTACGTCTTTCGGGTACCTACTACTGT	180
AM4122227	121	180
HQ283254	238	297
Lv U	181	CCTCGATGCGACCCACGGTGACGGCTTAGAGCCCGAGCGCTCGCCGGTTCGCGACGGTTC	240
AM4122227	181	240
HQ283254	298	357
Lv U	241	AAAGAGTGGCCGGCTCGGCTCTGCTCGAGAGTTGACAGCCGGTGACCGCCCGTTCGTCAG	300
AM4122227	241	297
HQ283254	358	414
Lv U	301	TCCGAAAACAGGAGGTTTAGTCCCGGGTACCTATGCCCTGCCTGCGCTCGCTCTCGGTG	360
AM4122227	298	356
HQ283254	415	473
Lv U	361	CAGGTAGGGCGGTAGCTCCAAGCTCGCTATTTGGCCGCGAGGTTCAAAGAGACGACCGTG	420
AM4122227	357	416
HQ283254	474	533
Lv U	421	CTTGCAATTACTTTGCAGGCAGCAACGGTCGCCGCCCGGGCCTCCTAAAATTTTCCTTT	480
AM4122227	417	476
HQ283254	534	593
Lv U	481	ACAAACCAAAAAATATTTTTTTATTTATTTGTCGGTCGACTCGATCGTGGCATAACGGTCG	540
AM4122227	477	536
HQ283254	594	653
Lv U	541	GTCGGCGTGAAGAAAAACAAAAAAGTCTAT	572
AM4122227	537	568
HQ283254	654	685

Figura 28. Comparación entre la secuencia consenso para el ITS1 de *L. viatrix* cepa SP, y la informada previamente para *L. neotropica* (GenBank accession number AM4122228)

Lv SP	1	ATCATTACGAATGAATGAGTAGCAACAACACACACTGTGAGTTGGTTGTCTCAGTCACT	60
AM4122228	1	60
Lv SP	61	CTGATTCAGTCAGTCGGTTGGCCCCGGGCAGACACGCATGAAGCGCTGTCGACACGGGG	120
AM4122228	61	120
Lv SP	121	GCTGTGTACGTTTCGTCTTTCGGGGTACCTATTACTGTCTCGGTGCGACCCACGGTGAC	180
AM4122228	121	180
Lv SP	181	GGCTTAGAGCCCAGCGCTCGCCGGGTCGCGACGGTTCAAAGAGTGGCCGGCACGGCTCT	240
AM4122228	181	240
Lv SP	241	GCTCGAGAGTCAGCCGGCGACCGCCCGTCCGAAAAATCCAGGAGTTAGTCCGGGG	300
AM4122228	241	300
Lv SP	301	TACCTATGCCCTGCCAGCGCTCGCTCTCGGTGCTGGTAGGGCGGTAGCTCCAAGCTCGCT	360
AM4122228	301	360
Lv SP	361	ATTTGGCCGCGAGGTTCAAAGAGACGACCACCCCGTGCAGTGCAACGGTGGTCGCCGCC	420
AM4122228	361	420
Lv SP	421	CCGGCCTCCTAACATTTCTTTACAAACAAAACAAATTTATTTTATTGTCGGTCGACT	480
AM4122228	421	480
Lv SP	481	CGATCGTGGCATAACGGTCGGTCGGCGTGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTTTT	533
AM4122228	481C.A.	533

Figura 29. Distribución de temperaturas, precipitaciones y exceso hídrico en el suelo para los grupos 1, 2 y 3, respectivamente.

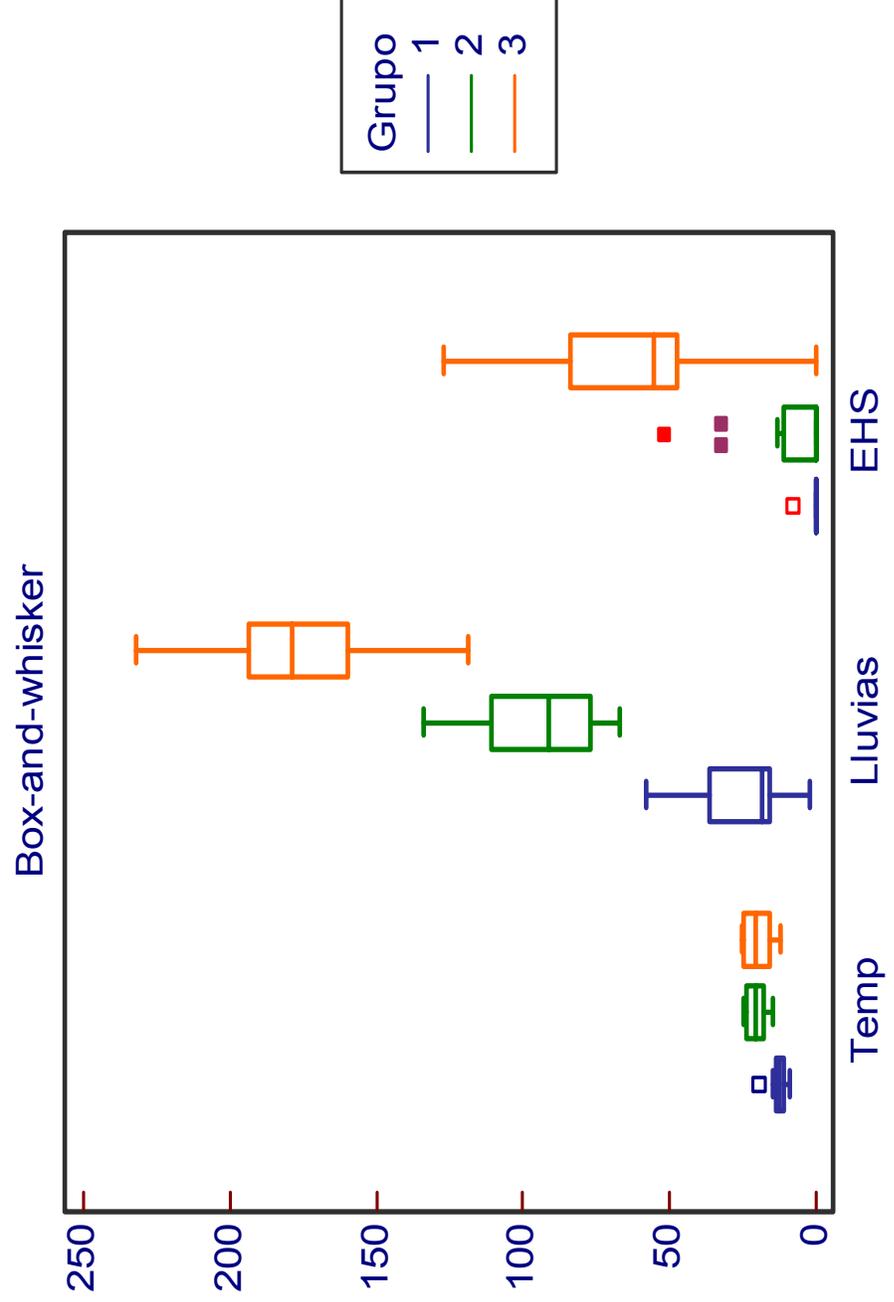


Figura 30. Regresión (modelo de poder) de la variable precipitaciones (independiente) sobre la prevalencia mensual y las medias aritméticas de los HPG.

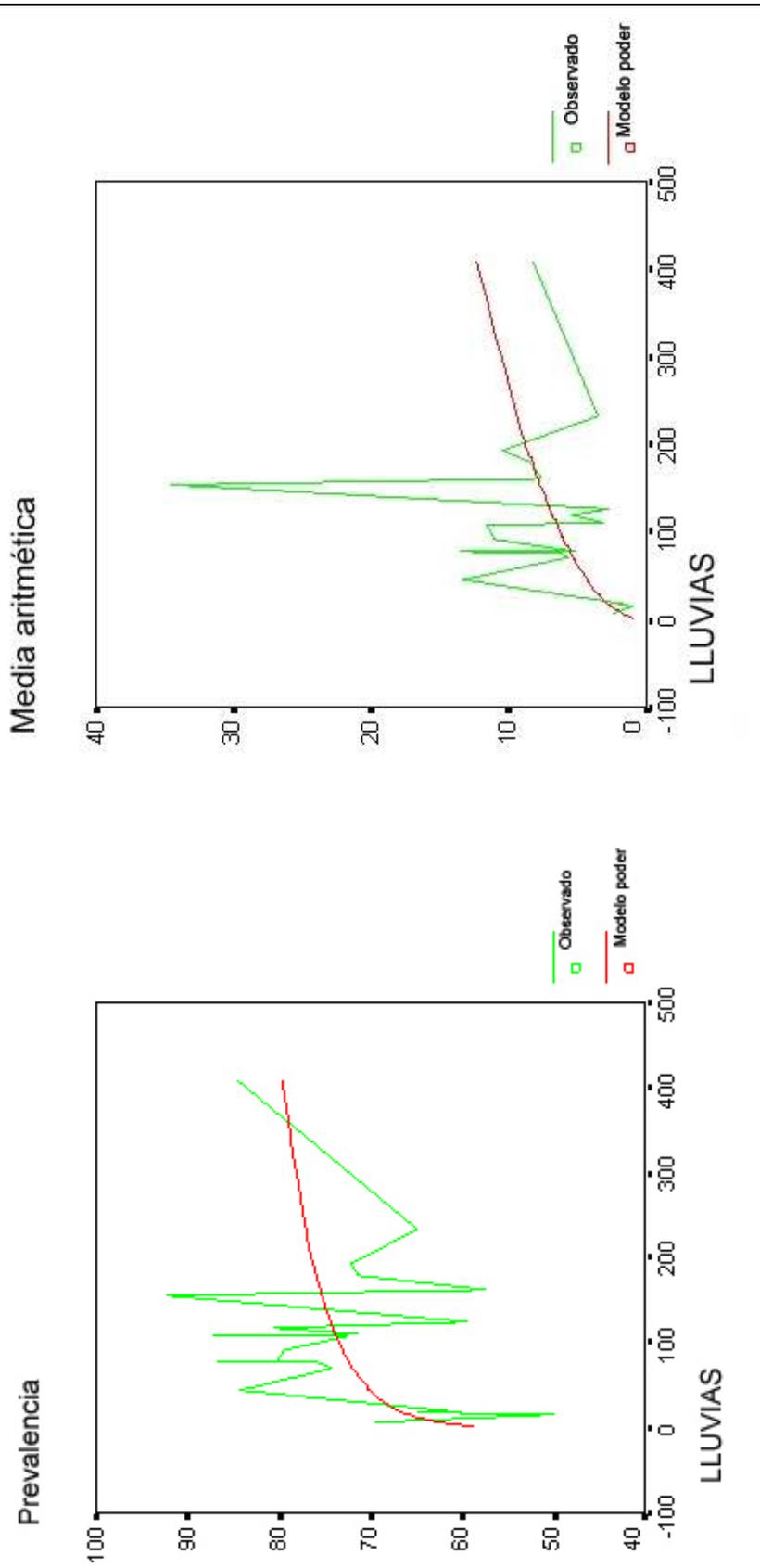


Figura 31. Tendencia anual de la primoinfestación en corderas para los años 2005, 2006 y 2007, expresada en media geométrica de los HPG.

