



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

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

**“Dinámica de la infestación por *Fasciola hepatica* en el sur de  
la provincia de Entre Ríos”**

AUTOR: Pruzzo, Cesar Iván

DIRECTOR: Sanabria, Rodrigo E

COORDIRECTOR: Romero, Jorge

LUGAR DE TRABAJO:

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE)  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Moré Gastón

Dra Ribicich Mabel

Dr. Unzaga Juan Manuel

**AÑO 2019**

**Índice de contenidos**

Abreviaturas y símbolos	IV
Trabajos presentados en congresos y reuniones científicas	VII
Agradecimientos	IX
Resumen	1
Abstract	3

**Capítulo 1: Introducción**

1.1 Generalidades	5
1.2 Descripción del parásito	7
1.3 Hospedador definitivo	12
1.4 Hospedador intermediario	15
1.5 Control	18
1.6 Epidemiología	18
1.7 Hipótesis	24
1.8 Objetivos	25

**Capítulo 2: Objetivo I**

Dinámica de infestación por <i>Fasciola hepatica</i> en el ganado	
2.1 Introducción	26
2.2 Materiales y métodos	28
2.2.1 Lugares de estudio	28
2.2.2 Trabajo de campo y laboratorio	32

2.2.3 Obtención de datos climáticos, geográficos y confección de archivos SIG	34
2.2.4 Determinación del estado de resistencia a drogas	37
2.2.5 Análisis estadístico	38
2.3 Resultados	39
2.4 Discusión	46
<b>Capítulo 3: Objetivo II</b>	
Análisis de la genética poblacional de <i>Fasciola hepatica</i> en el sur de la provincia de Entre Ríos	
3.1 Introducción	50
3.2 Materiales y métodos	53
3.3 Resultados	57
3.4 Discusión	63
<b>Capítulo 4: Objetivo III A</b>	
Identificación de lymneidos mediante criterios moleculares	
4.1 Introducción	67
4.2 Materiales y métodos	70
4.2.1 Colecta y procesamiento del hospedador intermediario	70
4.3 Resultados	74
4.4 Discusión	76
<b>Capítulo 5: Objetivo III B</b>	
Abundancia y estructura poblacional de lymneidos	

5.1 Introducción	78
5.2 Materiales y métodos	80
5.3 Resultados	82
5.4 Discusión	84
<b>Capítulo 6: Objetivo IV</b>	
Evaluación de la susceptibilidad de los lymneidos a la infestación por <i>Fasciola hepatica</i>	
6.1 Introducción	88
6.2 Materiales y métodos	89
6.3 Resultados	92
6.4 Discusión	93
<b>Capítulo 7: Conclusiones</b>	95
<b>Capítulo 8: Bibliografía</b>	100

**Abreviaturas y símbolos.**

**A:** adenina

**ABZ:** albendazol

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNmt:** ácido desoxirribonucleico mitocondrial

**AHI:** abundancia del hospedador intermediario

**°C:** grados centígrados

**cm:** centímetros

**COI:** citocromo oxidasa 1

**CSTL:** closantel

**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**DS:** desvío estándar

**Fis:** coeficiente de endogamia

**Fst:** índice de fijación

**Grs:** gramos

**G:** guanina

**HD:** hospedador definitivo

**He:** heterogenicidad esperada

**HI:** hospedador Intermediario

**Ho:** heterogenicidad observada

**HPG:** huevos por gramo

**ICNZ:** código internacional de nomenclatura zoológica

**kg:** kilogramos

**mg:** miligramos

**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio

**mM:** milimolar

**MTC:** metacercarias

**n:** número de animales o especímenes muestreados

**NADI:** nicotinamida adenina dinucleótido 1.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

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

**S:** Tasa de autofecundación

**SIG:** sistemas de información geográfica

**SRT:** secuencias repetidas en tándem

**T:** timina

**T°:** temperatura

**TCBZ:** triclabendazol

**TRRH:** test de reducción del recuento de huevos

**WHO:** World Health Organization

**μl:** microlitros

**μm:** micras o micrómetros

**Trabajos presentados en congresos y reuniones científicas vinculados a esta tesis**

1. First report of *Lymnaea neotropica* in northeastern Argentina: morphological and molecular identification. Pujadas Julieta, Wisnivesky Cristina, Pruzzo Cesar, Sanabria Rodrigo, Farber Marisa, Prepelitchi Lucila. En: Congreso Mollusca, 2014, México.

2. *Fasciola hepatica*: spread of albendazole resistance in Central Eastern Argentina. Cesar Pruzzo, Rodrigo Sanabria, Daniel Medus, Giuseppe Reyna, Jorge Romero. En: Congreso, Waavp, 2015, Liverpool.

3. Datos de texturas sobre tipos de suelos utilizando Sistemas de Información Geográfica y su correlación con la prevalencia de *Fasciola hepatica* en el sur de la provincia de Entre Ríos. Pruzzo Cesar Iván, Illanes Federico, Niño Uribe Álvaro, Raffo Fernando, Sanabria Rodrigo. En: Jornada Jóvenes Investigadores UBA, 2017, Buenos Aires.

4. Genetic diversity of *Fasciola hepatica* isolated from three definitive hosts in Cajamarca's valley, Perú. Giuseppe Reyna, Rodrigo Sanabria, Eva Rueda, Cesar Pruzzo, Corpus Cerna, Severino Torrel, Pedro Ortíz. En: 113th International Congress of Parasitology, 2014, México.

5. Cathepsin L3 from *Fasciola hepatica* induces IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion in a NLRP3 dependent manner on dendritic cells. Celas Daiana, Silvane Leonardo, Corvo Ileana, Fresno Manuel, Arranz Alicia, Pruzzo César, Sanabria Rodrigo,



Cervi Laura. En: XII Congress of the Latin American Association of Immunology & XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology, 2018, México.

6. A murine model to assess anthelmintic resistance in *Fasciola hepatica*: preliminary study. Pruzzo Cesar, Ceballos Laura, Alvarez Luis, Sanabria Rodrigo. En: Congreso Drug discovery for neglected diseases international 4th scientific meeting of resnet npnd, 2018, Buenos Aires.

7. The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. L Ceballosa Cantona, Cesar Pruzzo, Rodrigo Sanabria, Laura Morena, Jaime Sanchis, Gonzalo Suarez, Pedro Ortiz, Ian Fairweather, Carlos Lanusse, Luis Alvarez, María Martínez Valladar. 2019. Vet Parasitol. 271:7–13.

## **Agradecimientos**

Al laboratorio de diagnóstico e investigaciones veterinarias (CEDIVE) de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar este trabajo.

Al laboratorio Maladies Infectieuses et Vecteurs: Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC) del Intitut de Recherche pour le Devéleppement (IRD) en Montpellier, Francia, por su recibimiento, y predisposición para el procesamiento de las muestras.

Al Dr. Jorge Romero, por abrirme las puertas del CEDIVE, compartir sus conocimientos de parasitología y por permitirme realizar esta investigación.

Al Dr. Rodrigo Sanabria, mi director, por elegirme e introducirme en el mundo de la investigación; por su paciencia, su tiempo, comprensión y compartir conmigo su conocimientos.

A la Dra. Pilar Alda, por haberme permitido vivir una muy grata experiencia en el exterior del país, y por su gran aporte a la distancia.

A la Dra. Marial Laura Vignau, por introducirme en el mundo de la parasitología, por dedicarle tiempo a la lectura de la tesis y brindarme sus consejos.

A Dr. Gaston Moré por sus consejos y su predisposición para resolver problemas y dudas.

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Federico, Álvaro, Magalí Catalina, Luis, Hector y Juan Carlos, por escucharme en los momentos difíciles, por aconsejarme, ayudarme y alentarme a seguir.

A los pasantes del laboratorio: Colito, Carolina, Sabrina y Solana, por el entusiasmo y la colaboración en los trabajos relacionados a esta tesis.

A la familia Saizar, por brindar su establecimiento y colaboración, y por el siempre cálido recibimiento.

A la familia Ferrer, por dejarme realizar el trabajo en su campo.

Al Médico Veterinario Román Allekotte, por su cooperación para conseguir los campos para el muestreo.

Al Médico Veterinario Daniel Medus del INTA Concepción del Uruguay, por su colaboración en los trabajos de campo.

Al Médico Veterinario Federico Raffo del INTA Bariloche, por resolver mis dudas e inquietudes con los sistemas de información geográfica.

A mis amigos, por acompañarme y escucharme siempre.

A mis hermanos, Miriam, Fran e Ivana, y sobrinos, Ailen, Laila, Yago, Regina y Daira. A mi tía Norma, tío Carlos y mis primas Florencia, Eli y Eve, por estar siempre, escucharme, contenerme, alentarme.

A mi mamá y papá, por trasmitirme lo importante de esforzarse, trabajar, por el apoyo y acompañamiento de siempre, muchas veces sin entender el para qué o el por qué; por aprender conmigo, por su amor incondicional.

A Luky, mi compañero de vida, por transitar conmigo esta experiencia, por su paciencia, por animarme y aconsejarme cuando las cosas no iban bien, por sostenerme y superar cada inconveniente que se nos fue presentando, por hacerme crecer, por ser parte de mi vida. Por caminar a mi lado.

## **Dinámica de la infestación por *Fasciola hepatica* en el sur de la provincia de Entre Ríos**

### **Resumen**

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, producida en el continente americano por *Fasciola hepatica*; los adultos de estos trematodes se encuentran en los canalículos biliares de una amplia variedad de mamíferos, siendo los ovinos y bovinos aquellos en los que se producen las mayores pérdidas económicas y productivas. Es una afección zoonótica, considerada por la OMS como una de las enfermedades desatendidas. Argentina presenta zonas endémicas, siendo la cuarta enfermedad con mayor importancia en el ganado vacuno. La provincia de Entre Ríos se encuentra en el tercer puesto de producción ganadera a nivel nacional y esta parasitosis es diagnosticada con frecuencia. Con la finalidad de conocer la dinámica de infestación en los hospedadores definitivos (HD) e intermediarios (HI) se realizaron muestreos trimestrales en seis establecimientos del sur de dicha provincia durante los años 2013 a 2015. Se determinó la dinámica de infestación en el ganado bovino, se identificaron mediante técnicas moleculares los diferentes aislados de adultos de *F. hepatica*, así como también, sus hospedadores intermediarios. Se estudió la dinámica y estructura poblacional de estos últimos, además de evaluar la susceptibilidad diferencial a las infestaciones por *F. hepatica* en las diferentes poblaciones de lymneidos.

En el sur de la provincia de Entre Ríos, la fasciolosis se presentó de forma endémica, estando presente todos los meses del año en los bovinos, con valores de prevalencia mayores al 40%. Se detectó además una predominancia a la heterocigosis en las poblaciones de *F. hepatica*, indicando así una mayor tasa de fecundación cruzada respecto a la autofecundación. Adicionalmente, se comprobó resistencia generalizada a albendazol en la región.

*Galba cubensis* fue la única especie identificada como HI. Si bien no se hallaron infestaciones a campo, las infestaciones experimentales demostraron que esta especie es un excelente HI, ya que el 60 % de las infestaciones experimentales fueron exitosas.

Al no registrar períodos de sequía durante el lapso de estudio, los excesos hídricos estuvieron disponibles en el terreno durante todo el tiempo. La retención de agua se relacionó con la tasa de infestación, ya que los establecimientos con mayor proporción de textura de suelo franca (bajo drenaje), presentaron mayor prevalencia de *F. hepatica* en el ganado.

Palabras Clave: *Fasciola hepatica*; *Galba cubensis*; infestación, epidemiología.

## ***Fasciola hepatica* infection dynamics in southern Entre Rios**

### Abstract

Fasciolosis is a worldwide spread parasitic disease. In America, it is produced by *Fasciola hepatica*, whose adults are found in the bile ducts of mammals, causing production losses in cattle and sheep. As well, it is considered as a zoonotic neglected disease by WHO.

The province of Entre Rios is third in cattle stock in Argentina, and this parasitic disease is frequently diagnosed. To better understand the infection dynamics on the definitive and intermediate hosts, seasonal samplings were carried out between 2013 and 2015, on six southern farms of this province. Either flukes and their intermediate hosts were identified on molecular basis, in order to search for species, groups or clades, and their relationship with the observed phenotypes and epidemiological features.

Additionally, the population structure and susceptibility to infection were studied in the intermediate host.

According to the results, fasciolosis was regionally endemic all over the year for cattle, with a prevalence over 40%. Heterozygosis predominated in the populations of *F. hepatica*, thus indicating a dominance of cross mating over self-fecundation mechanisms. Additionally, anthelmintic resistance to albendazole was detected in all the studied farms.

*Galba culbensis* was the only snail species identified as intermediate host. Even though snails weren't found infected out in the field, experimental infections succeed over 60%.

Without records of dry seasons during the study, water was available in the field all the time. Regarding this fact, a high prevalence of *F. hepatica* in cattle was statistically associated to poorly drained soils.

Key Words: *Fasciola hepatica*; *Galba cubensis*, infection, epidemiology.

## **1. Introducción**

### **1.1 Generalidades**

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria ampliamente distribuida en el mundo. En Argentina como en el resto del continente americano, el agente etiológico es *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea), en países de Asia y África, además de esta especie está presente *Fasciola gigantica*.

Los adultos de *F. hepatica* se ubican en los canalículos biliares de una variedad de hospedadores.

La presentación de la fasciolosis difiere según la especie a la que afecta: los equinos y los cerdos son de baja susceptibilidad y los rumiantes de moderada a alta, por ende, se producen elevadas pérdidas productivas y económicas (Olaechea *et al*, 2011).

Su potencial zoonótico es un factor importante, siendo Sudamérica una de las regiones más afectadas, con amplia distribución de casos humanos en países como Perú (Marcos *et al.*, 2007) y Bolivia (Recalde *et al.*, 2014). En ambos países la fasciolosis se considera regionalmente endémica, y de gran importancia en salud pública. En Argentina hay pocos casos humanos registrados debido a que no es una enfermedad de denuncia obligatoria; los mismos se hallan particularmente concentrados en las regiones andinas (Rubel *et al.*, 2005, Mera y Sierra *et al.*, 2011).

La OMS considera a la fasciolosis entre las enfermedades desatendidas, registrándose un aumento de reportes de casos humanos (WHO, 2008).



Se estimó que el costo por pérdidas directas e indirectas por *F. hepatica* es, a nivel mundial, de más de 3,000 millones de dólares anuales (Boray, 1997). Respecto a los rumiantes, se estima que 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos, habitan en lugares donde *F. hepatica* está presente (Beesley *et al.*, 2017). Su frecuencia es elevada en zonas con lluvias moderadas a intensas, aunque también, ocurren casos en zonas más secas, valles pantanosos, arroyos, bañados e inclusive canales de riego, donde puede habitar su hospedador intermediario, un caracol dulceacuícola de hábitos anfibios de la familia Lymnaeidae.

En los ovinos, se registran pérdidas por mortandad, reducción en la producción (carne, leche, lana), deterioros en la condición corporal y disminución de las pariciones (Robles y Olaechea, 2001). En los bovinos las pérdidas son más difíciles de discernir y dependen de la categoría afectada y la carga parasitaria, observándose en menor medida disminución de la ganancia diaria de peso, menor conversión alimentaria y producción de leche. Se han reportado reducciones en la ganancia diaria de peso entre 8 y 28% en terneros (Ross, 1970; Hope and Cawdery, 1977, Chick *et al.*, 1980). Por otra parte, Cardozo *et al.* (1991), no encontraron diferencias productivas o reproductivas entre vaquillonas parasitadas por *F. hepatica*, en comparación con compañeras desparasitadas. No obstante, las mayores pérdidas podrían imputarse principalmente a los costos de tratamientos antihelmínticos, de los decomisos de hígados en frigoríficos y a que las reses son clasificadas de calidad inferior. En Uruguay, por ejemplo, se decomisaron un 37,5 % de los hígados bovinos durante el

período 2007-2008 por lesiones vinculadas a *F. hepatica* (Olaechea *et al.* 2011).

Otro aspecto a tener en cuenta son las enfermedades asociadas a *F. hepatica*. Son conocidas las pérdidas por mortandades asociadas a hemoglobinuria bacilar (*Clostridium haemolyticum*) en bovinos, y hepatitis infecciosa necrosante en ovinos (*Clostridium novy* tipo B); estas bacterias anaeróbicas proliferan en las áreas necróticas producidas por migración de *F. hepatica*, elaborando potentes exotoxinas. Se mencionó, además, que la infección por *F. hepatica* puede inducir reducción de la respuesta inmunológica mediada por linfocitos Th1, frente a bacterias intracelulares como *Mycobacterium bovis*, causante de la tuberculosis, pudiendo, entre otras cosas, alterar la prueba de diagnóstico para esta enfermedad en el ganado vacuno, e incrementar la susceptibilidad a la infección (Flynn *et al.*, 2009).

## **1.2 Descripción del parásito:**

*Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)

*Phylum:* Platyhelminthes

Clase: Trematoda

Subclase: Digenea

Orden: Echinostomata

Superfamilia: Echinostomatoidea

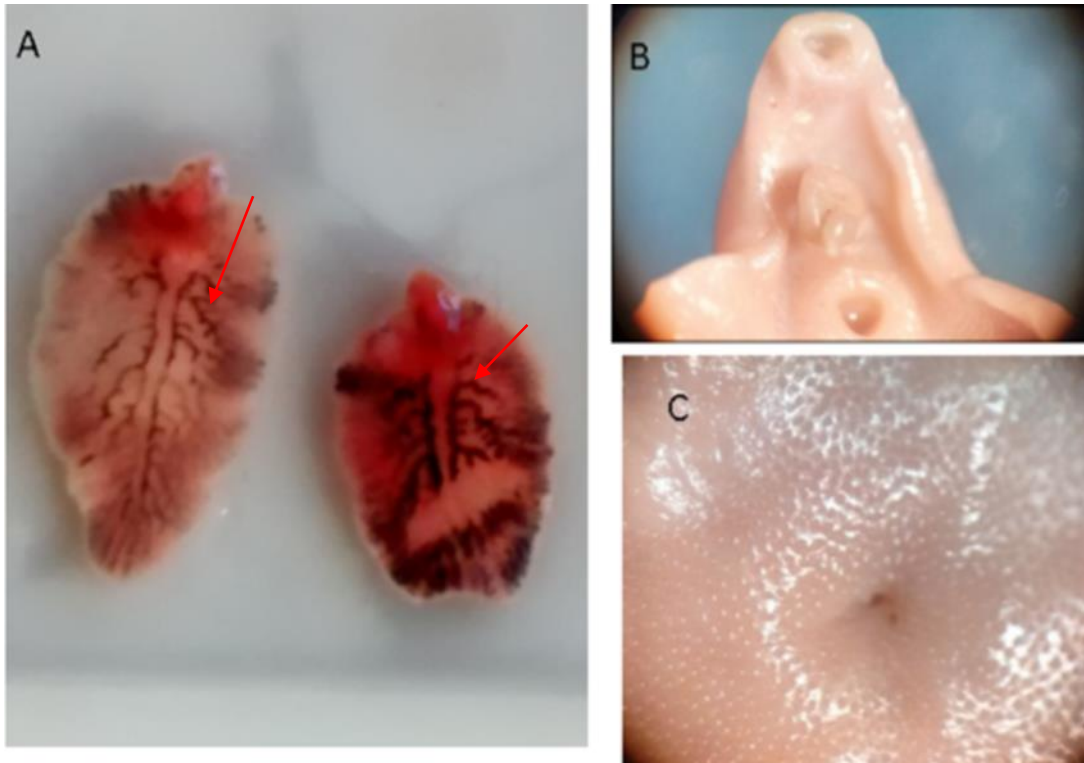
Familia: Fasciolidae (Schmidt y Roberts, 1977)

*F. hepatica* es un helminto hermafrodita, cuerpo ancho, aplanado dorso ventralmente, mide de 18 a 50 mm de largo por 4 a 13 mm de ancho. Está provisto de dos ventosas próximas entre sí, una ubicada en el proceso cónico proximal donde se encuentra la boca, denominada ventosa oral, en tanto la ventosa ventral es de mayor tamaño y se denomina acetábulo (fig. 1.1, A y B).

Posee un aparato digestivo incompleto con dos ramas ciegas con numerosos divertículos laterales. El aparato reproductor se constituye por dos testículos ramificados, que ocupan la parte media corporal, y el ovario y útero están ubicados anteriormente a éstos. Las glándulas vitelógenas, ocupan los márgenes laterales de los adultos, y los conductos de estas glándulas confluyen, junto con las glándulas de Mehlis en el ootipo. Aunque su condición hermafrodita permite autofecundación, por lo general éste fenómeno ocurre en forma cruzada (Adrews, 1999). El tegumento presenta espinas (Figura 1.1 C), siendo metabólicamente activo en términos de absorción de nutrientes, osmorregulación, protección contra el hospedador y otros parásitos, y digestión, entre otras funciones (Fairweather, *et al.* 1999).

Para completar su ciclo biológico, *F. hepatica* necesita que coexista su HD mamífero (reproducción sexual), y su HI (reproducción asexual), un caracol del género *Galba* (*syn. Lymnaea*) (Figura 1.2).

**Figura 1. 1** *Fasciola hepatica*



**A)** Adultos. Se observa el ciego ramificado en color oscuro (flechas). **B)** Extremo anterior. Se observan ambas ventosas y entre estas el poro genital. **C)** Tegumento recubiertos por espinas.

Los huevos, elipsoidales y de color amarillento, son eliminados por el HD junto con la materia fecal, y miden de 120 a 140  $\mu\text{m}$  de largo x 60 a 90  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1.3.A). Un solo ejemplar de *F. hepatica* puede poner entre dos y cinco mil huevos al día (Rojo Vazquez y Ferre Perez, 1999). Para el desarrollo del huevo, es indispensable una cubierta de agua, y un rango de temperatura entre 10 °C a 30 °C. A menos de 10 °C se mantienen viables, pero no continúan su desarrollo, y por encima de 37 °C pierden viabilidad.

Entre los 23 °C y los 26 °C se desarrolla dentro del huevo el **miracidio** (Andrews, 1999) (Figura 1.2. A), de forma cónica y aproximadamente 130µm de largo, rodeado por cilias. Posee en su extremo anterior, una protuberancia papiliforme y órganos fotosensibles (Figura 1.2. B). El miracidio nada activamente en busca del HI, atraído específicamente por determinadas especies de moluscos, fenómeno definido como quimiotaxis con adaptación (Thaddeus *et al.*, 1999). Una vez infectado, el caracol puede permanecer en este estado de por vida (Torgerson y Claxton, 1999).

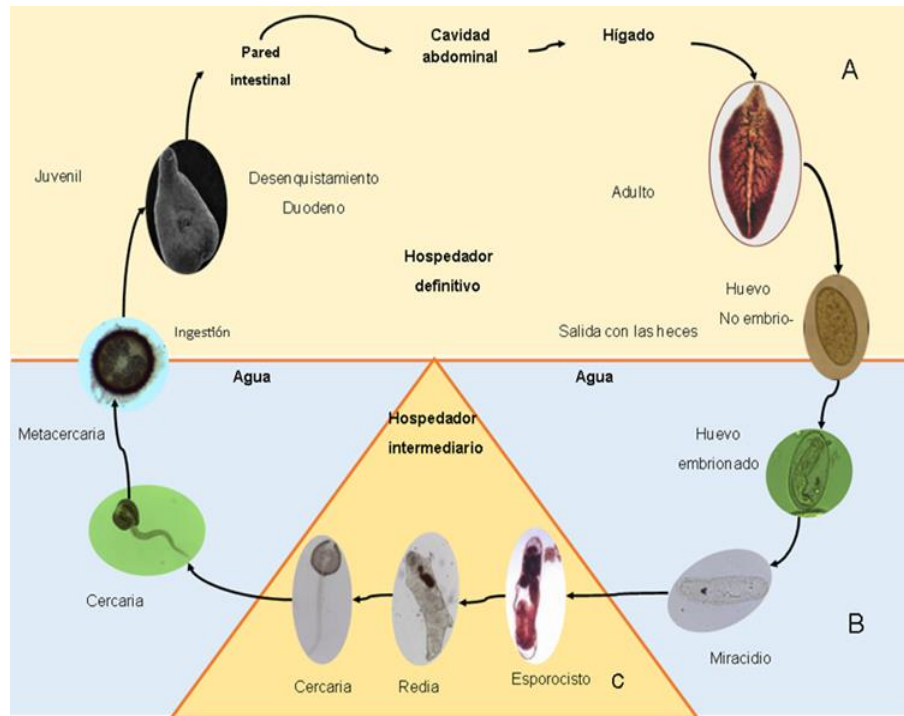
El miracidio penetra en el tegumento del caracol activamente mediante una descarga enzimática, luego pierde rápidamente sus cilias y se transforma en el primer estadio larval dentro del molusco denominado **esporocisto** (Figura 1.2.C), ubicándose en la región peri esofágica del caracol. Su forma es similar a un saco, con numerosas células germinativas, que dan origen a las **redias** (Figura 1.2. D). Estas son de forma cilíndrica, miden de 1 a 2 mm de largo, y poseen un aparato digestivo consistente en faringe e intestino ciego. Se alimentan del tejido hepatopáncreático y gónadas del caracol, dado su alto contenido en lípidos, que servirán luego de reserva para las formas larvarias de vida libre. Las redias presentan células germinativas que se multiplican y darán origen a segundas o terceras generaciones de redias, o bien al siguiente estadio, las **cercarias** (Figura 1.2. E). Este estadio permite nuevamente el desplazamiento acuático. Las cercarias miden de 250 a 300 µm y presentan un cuerpo discoidal y una larga cola. Éstas abandonan el caracol 6 a 7 semanas después de la infestación (dependiendo de la temperatura exterior), por migración a través

de los tejidos del molusco y nadan en el agua hasta tomar contacto con una superficie plana, ya sea de la vegetación, rocas, o inclusive la superficie del agua en algunos casos (Andrews, 1999). Tras este contacto, la cercaria enquistada, perdiendo su cola y rodeándose de una cubierta resistente secretada por las glándulas cimógenas. Este estadio, denominado **metacercaria** (MTC) (Figura.1.2. F), es la forma infectante para el HD. Son muy sensibles a las altas temperaturas y a la desecación (Andrews, 1999). Uno de los factores que contribuye a la propagación de la fasciolosis es la multiplicación asexual dentro del HI, ya que un solo miracidio puede llegar a producir más de mil MTC (Sanabria *et al.*, 2012).

La infestación de los rumiantes tiene lugar principalmente durante el pastoreo, o bien raramente, por la ingesta de agua contaminada con MTC. No obstante, menos del 50% de ellas tiene éxito en su implantación. La patogenicidad de *F. hepatica* depende del número de MTC ingeridas y de su capacidad de implantación, ya que se ha comprobado que su capacidad infectante también depende de las condiciones climáticas durante su enquistamiento, y del tiempo de permanencia dentro del caracol y en el exterior (Rojo Vázquez y Ferre Pérez, 1999).

Una vez que las MTC son ingeridas por el HD, se liberan las formas juveniles o fasciolómulos, los cuales atraviesan la pared intestinal, y entre los 4 y los 6 días post infestación alcanzan el hígado, atraviesan la capsula de Glisson y migran a través del parénquima hepático hasta alcanzar los conductos biliares entre la séptima y octava semana. Durante este proceso migratorio se producen lesiones que causan intensas hemorragias y fibrosis

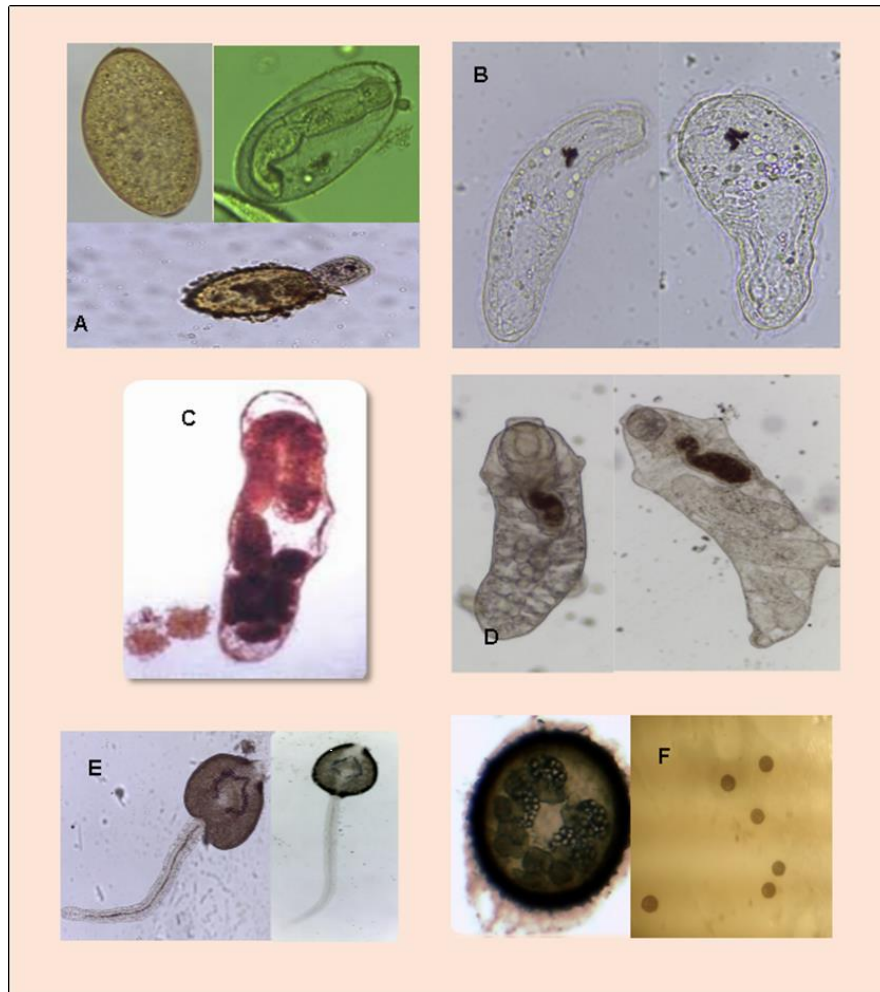
(Adrews, 1999). A partir de la octava semana comienza el periodo de patencia de la infección, pudiéndose recuperarse los huevos en la materia fecal del hospedador.



**Figura 1.2.** Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*. A: Desarrollo en el HD, B: desarrollo en el medio ambiente, C: desarrollo en el HI.

### 1.3 Hospedadores definitivos

*Fasciola hepatica* presenta un amplio espectro de hospedadores definitivos, siendo frecuente en ovinos, bovinos, caprinos, equinos, porcinos, varios mamíferos silvestres, y seres humanos (Hurtrez-Bousses *et al.*, 2001).



**Figura 1.3.** Estadios de *Fasciola hepatica* **A)** Huevo no embrionado, embrionado y eclosión de miracidio **B).** Miracidios. **C)** Esporocisto. **D)** Redia **E)** Cercarias **F)** Metacercarias

Los niveles de infestación varían entre sitios y especies, en humanos la variabilidad podría explicarse particularmente por las características y hábitos alimenticios, como por ejemplo el consumo de plantas acuáticas o infusiones a partir de estas (Mas-Coma *et al.*, 1998).

El espectro de hospedadores también difiere de una región a otra, ejemplo de ello son los cerdos, los cuales son hospedadores ocasionales en la



mayoría de los países, mientras que en el altiplano boliviano representa el segundo hospedador que actúa como reservorio (Mas - Coma *et al.*, 1998). El Coipo o falsa nutria (*Myocastor coypus*), es el reservorio silvestre más estudiado en Sudamérica, presentando prevalencias que rondan el 55% (Hurtrez-Bousses *et al.*, 2001). No obstante, los ovinos y los bovinos son hospedadores definitivos más importantes desde el punto de vista epidemiológico y productivo.

Se ha demostrado que incluso, dentro de una misma especie, hay diferencias de susceptibilidad entre razas. Por ejemplo, ovinos raza St. Croix produjeron significativamente menor cantidad de adultos en hígado que otras tres razas ante el mismo desafío experimental (Boyce *et al.*, 1987). La raza Indonesian Thin Tail fue estudiada por su resistencia a *F. gigantica*, pero no a *F. hepatica*, proceso que parece estar mediado por la expresión de determinado perfil de citoquinas de tipo 1 (Pleasance *et al.*, 2011).

La fasciolosis puede presentarse en su forma aguda, subaguda o crónica, de acuerdo con los signos clínicos y a los hallazgos de necropsias, dependiendo del número de parásitos que se encuentren en el hígado (Rojo Vázquez y Ferré Pérez, 1999).

La forma aguda se produce por una masiva migración de formas inmaduras a través del parénquima hepático, y se caracteriza por ascitis, hemorragia abdominal, anemia y letargia, llevando rápidamente a la muerte antes del período prepatente. Las infestaciones masivas en un corto período son

especialmente graves para bovinos jóvenes, y ovinos y caprinos de todas las edades (Malone, 2010).

En la forma subaguda, la ingesta de MTC es continua en el tiempo, por lo cual rara vez se produce la muerte del animal. En el hígado se pueden observar tanto formas inmaduras como maduras de *F. hepatica*. Los animales pueden exhibir letargo, anemia, edema palpebral y ascitis, entre otros signos.

Finalmente, la forma crónica se desarrolla cuando la ingesta es menor a 10 MTC/ día (Rojo Vázquez y Ferré Pérez, 1999), por un tiempo prolongado, y los signos se presentan por la existencia de los parásitos adultos en los conductos biliares, siendo los más evidentes, pérdida de peso, anemia, ascitis y edema submandibular. Los bovinos son susceptibles a temprana edad, pero pueden desarrollar elevada resistencia por lo cual raramente ocurre la muerte por *F. hepatica* en animales adultos (Olaechea *et al.*, 2007). Sin embargo, la migración de las formas juveniles produce un ambiente anaerobio propicio para la proliferación de *Clostridium haemolyticum* y *C. novyi* tipo D, predisponiendo al desarrollo de “hemoglobinuria bacilar” y “hepatitis infecciosa necrosante”, respectivamente.

#### **1.4 Hospedador intermediario**

*Fasciola hepatica* depende para su transmisión de la presencia de caracoles pertenecientes a la familia Lymnaeidae.

Dentro de esta familia se encuentran un gran número de especies de caracoles de agua dulce cuya sistemática, aun, continúa sujeta a controversias (Kleiman *et al.*, 2004; Prepelitchi, 2009; Correa *et al.*, 2010; Lounnas *et al.*, 2016; Alda *et al.*, 2018). Antes de la masificación de las técnicas de biología molecular, la identificación de las especies se basaba en la morfología de la conchilla y del aparato reproductor masculino (Pontier *et al.*, 2008). En base a estos criterios, Baker (1908) reconoció a 113 especies de lymneidos, y las dividió en 7 géneros: *Acella*, *Bulimnea*, *Lymnaea*, *Pleurolymneaea*, *Pseudosuccinea*, *Radix* y *Galba*. Más tarde, Hubendick (1951), realizó una comparación morfológica a nivel mundial planteando que era injustificable la división en tantas especies y subespecies debido a su gran uniformidad anatómica dejando a *Lymnaea* como único género válido.

Ambas maneras de clasificación hoy siguen estando vigentes, generando confusión al referirse a las distintas especies, ya que estas se pueden nombrar de dos o incluso tres maneras diferentes (Prepelitchi, 2009). Luego, se comenzaron a utilizar diferentes marcadores moleculares, como los segmentos codificantes para subunidades ribosomales 18S y 16S (Bargues y Mas Coma, 1997; Remigio y Blair, 1997), espacios internos transcritos (ITS) 1 y 2 del ADN ribosómico (Carvallo *et al.*, 2004; Vidigal *et al.*, 2004) y otros genes como citocromo oxidasa I mitocondrial (Mera y Sierra *et al.*, 2009; Pujadas *et al.*, 2014), permitiendo la diferenciación y agrupación de especies. El empleo de marcadores microsatélites, permitió,

gracias a un mayor polimorfismo que los anteriores, una clara diferenciación en especies (Lounnas *et al.*, 2016; Alda *et al.*, 2018).

La presencia, abundancia y estructura poblacional de estos lymneidos depende de la interrelación de factores intrínsecos y extrínsecos de su hábitat, tanto abióticos como bióticos (Prepelitchi, 2009).

Dentro de los factores bióticos, la predación y la competencia interespecífica, juegan un rol fundamental (Dillon, 2000). Por otra parte, la temperatura es uno de los principales factores abióticos que influye en la presencia, crecimiento y desarrollo de los lymneidos, siendo óptima entre los 10 y 30°C (Torgerson y Claxton, 1999). La humedad también es condicionante, ya que los lymneidos solo pueden crecer y desarrollarse en ambientes saturados de agua.

Cuando las condiciones son desfavorables, estos moluscos sobreviven enterrados en suelos secos (estivación), y a bajas temperaturas hibernan retraídos en su conchilla (Boray, 1964). La supervivencia a su vez dependerá del tiempo durante el cual son sometidos a dichos factores adversos. No todas las especies de lymneidos pueden estivar, ejemplo de ello es *Pseudosuccinea columella* que necesita constantemente de la presencia de humedad (Prepelitchi *et al.*, 2004).

La especie más ampliamente descrita a nivel mundial como HI es *Galba (Lymnaea) truncatula* (Odening y Amnaliev, 1977; Bargues y Mas-Coma, 1997). Esta presenta alta adaptabilidad a diferentes ambientes, desde llanuras a altitudes mayores a 4000 metros (Thaddeus *et al.*, 1999).

En Argentina la primera especie reconocida por Bacigalupo (1934), como HI fue *Lymnaea (Galba) viatrix* (Venturini, 1990), desde entonces se ha descrito ampliamente en países de América del sur, constituyendo junto a *G. truncatula* y *G. cubensis* los principales HI de *F. hepatica* (Venturini., 1990; Kleiman *et al.*, 2007; Pointier *et al.*, 2006).

### **1.5 Control**

El control la fasciolosis debe estar orientado a prevenir o limitar el contacto del hospedador definitivo con el parásito. Los fármacos fasciolicidas más utilizados en nuestro país y en otras partes del mundo son el albendazol (10mg/kg), closantel, y clorsulón, entre otros, los cuales solo son eficaces frente a *F. hepatica* de más de 6 semanas (Malone, 2010).

El triclabendazol, es un bencimidazol halogenado ampliamente utilizado, y es eficaz contra estadios en migración por el parénquima hepático (90% de eficacia) y sobre ejemplares maduros (99%). La existencia de fasciolicidas eficaces, seguros y fácilmente aplicables, hizo del tratamiento farmacológico la forma más habitual utilizada por productores para su control, muchas veces de forma sistemática y sin el asesoramiento profesional, conllevando a la aparición de resistencia a los antiparasitarios más comúnmente utilizados en nuestro país, fundamentalmente triclabendazol (Olaechea *et al.*, 2011) y albendazol (Sanabria *et al.*, 2013).

### **1.6 Epidemiología**

Respecto a Argentina, *F. hepatica* ha sido descrita en casi todas las áreas geográficas y provincias, a excepción de Tierra del Fuego. Aunque el frío

es una barrera para su desarrollo, se la ha descrito hasta el paralelo 49°, en la meseta Patagónica de Santa Cruz (Aguilar, 2010). Además, se reportaron hallazgos en Corrientes (Prepelitchi *et al.*, 2005), Mendoza (Mera y Sierra *et al.*, 2005), Salta (Aguirre *et al.*, 2005), Entre Ríos (Sanabria *et al.*, 2013), Catamarca (Canevari *et al.*, 2014), y Buenos Aires (Entrocasso, 2004).

Las características climáticas, condicionan el riesgo y la estacionalidad de presentación de fasciolosis. Los veranos cálidos y húmedos representan condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento tanto de los estadios larvarios como de los caracoles. Por el contrario, en épocas con escasas precipitaciones y elevada evapotranspiración la supervivencia de los moluscos es limitada. Las MTC, forma infectante de *F. hepatica*, son muy susceptibles a la desecación, las radiaciones solares e incluso a temperaturas elevadas.

En aquellas regiones donde los inviernos presentan temperaturas medias por debajo de los 10°C, se inhibe el crecimiento y desarrollo de los moluscos, y estadios larvarios de *F. hepatica*. Las bajas temperaturas invernales mantienen viables las metacercarias y los huevos en el medio ambiente, siendo estos, y los caracoles sobrevivientes, el principal pie de infestación en la primavera siguiente (Olaechea, 2001).

La cercana relación entre las condiciones climáticas y la fasciolosis, hicieron necesario el desarrollo de modelos para la estimación de riesgo de esta enfermedad (Fox *et al.*, 2011). De hecho, el efecto del cambio climático, la expansión de la resistencia a drogas, y el desplazamiento del

ganado a zonas no aptas para la agricultura, entre otros factores, representaron un avance esta parasitosis (Mas-Coma *et al.*, 2009).

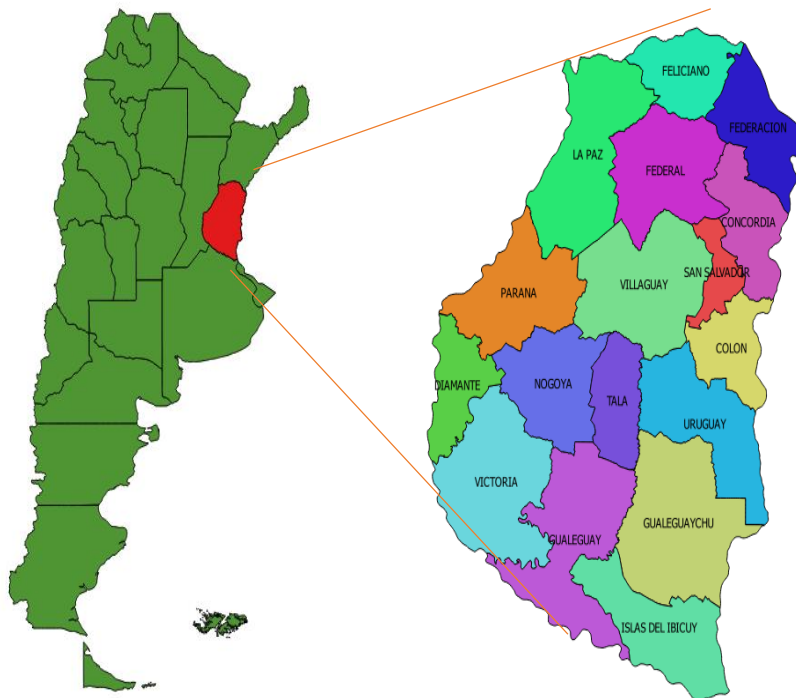
Se han generado modelos de dinámica de fasciolosis mediante la utilización de sistemas de información geográfica (SIG), facilitando así el manejo de la información epidemiológica, y eventualmente la toma de decisiones e implementación de estrategias para disminuir el riesgo de esta parasitosis (Dutra *et al.*, 2010; Charlier *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012).

Los SIG también pueden ser utilizados para la estimación de áreas endémicas o libre de una enfermedad y evaluar su posible dispersión, factores importantes, teniendo en cuenta que esta parasitosis no tiene la misma dinámica en todas las áreas geográficas. Ejemplo de ello son áreas endémicas opuestas, como la región sur de Chubut donde el ciclo de *F. hepatica* solo es activo durante los meses de noviembre a marzo (Olaechea, 2007), mientras que el Noreste, (Berón de Astrada, Corrientes), las temperaturas medias anuales son superiores a 10°C y el ciclo puede desarrollarse durante todo el año (Prepelitchi *et al.*, 2009). Conocer las características ambientales regionales permite comprender la dinámica de esta parasitosis, y así poder aplicar adecuadamente las medidas de control.

En la Argentina la dinámica de la fasciolosis se ha descrito, como se mencionó anteriormente, en la región norte, en la provincia de Corrientes (Prepelitchi, 2009) y en la región patagónica (Olaechea, 2007). Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad en la región Pampeana.

El sur de la provincia de Entre Ríos pertenece a esta región y debido a sus características, esta parasitosis se presenta con elevada frecuencia

(Sanabria *et al.*, 2012). Esta provincia se ubica entre los paralelos de 30° y 34° sur y meridianos 58° y 61° oeste, y se divide en 17 departamentos (Fig. 1.4). Posee una superficie de 78.781 km<sup>2</sup> e integra la región Mesopotámica, junto con Corrientes y Misiones. Se encuentra rodeada por el río Paraná al sur, al este por el río Uruguay y al norte por los ríos Guayquiraró y Mocoretá. La región sur presenta el Delta del Paraná con terrenos bajos y formación de islas. En total la provincia posee 41.790 kilómetros de ríos y arroyos.



**Figura 1.4.** *Departamentos de la provincia de Entre Ríos (QGis 2.18).*

El territorio entrerriano presenta ondulaciones suaves, con una pendiente que paulatinamente sube hacia el oeste y el norte. Se caracteriza por una marcada heterogeneidad en su topografía, suelos y vegetación. Se encuentra conformado por 77% de tierra firme, 20% de islas, delta, pre-delta y anegadizos, y 3% de agua.



La temperatura disminuye de norte a sur. En el noreste el clima es subtropical sin estación seca, los inviernos son suaves y en verano la temperatura supera los 26°C, siendo la media anual de 20°C. Las precipitaciones superan los 1.000 mm anuales y predominan los vientos norte, este y noreste. El centro y sur de la provincia presentan inviernos con temperaturas medias entre 7°C y los 10°C, y entre los 19°C y 23°C en verano. Prevalecen vientos del sur, sureste y noreste. Las precipitaciones, en promedio, son inferiores a los 1.000 mm anuales (Anuario Estadístico de la Provincia de Entre Ríos, 2014).

Entre Ríos se ubica en el tercer puesto a nivel nacional de producción ganadera. El stock de ganado vacuno se estimó en 4,48 millones de cabezas en el año 2015, representando el 8,71% del total nacional, y conforme datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, en 2015 se faenaron aproximadamente 419.680 cabezas. En lo referente a las razas, se crían principalmente europeas (Hereford, Aberdeen Angus y Shorthorn) productoras de carne, con menor proporción de tambos (alguna cita de datos productivos o link a datos ministerio).

Además, se ha registrado en la provincia un incremento notable en la actividad relacionada con el sector ovino, particularmente en la región norte, en el límite con Corrientes (Engler *et al.*, 2008).

El sistema productivo predominantemente ganadero, fue cambiando en las últimas décadas a agrícola-ganadero, destinando los suelos más aptos para agricultura, con el consiguiente desplazamiento de la ganadería a campos más marginales (suelos anegadizos, próximos a arroyos, ríos o

bañados), aptos para el desarrollo de esta parasitosis. Como en otras partes del mundo, la prevalencia de *F. hepatica* se ha incrementado posiblemente ligada a este tipo de desplazamiento de la ganadería (Olaechea *et al.*, 2007), y en la región mencionada la fasciolosis no ha sido estudiada con profundidad.

Por lo expuesto, este trabajo busca estudiar la dinámica de infestación por *F. hepatica* en el ganado en esta región y sus hospedadores intermediarios.

## **1.6 HIPOTESIS:**

- I. La fasciolosis se presenta en el ganado de la región sur de Entre Ríos en forma enzoótica, con variaciones estacionales e incluso interanuales. La relación entre las características climáticas y la infestación en el ganado permite establecer un índice de riesgo que puede actuar como predictivo en condiciones similares.
- II. Diferentes poblaciones de *F. hepatica* pueden ser caracterizadas mediante diferencias genotípicas.
- III. En la región existen diferentes especies, subespecies o poblaciones de lymneidos, que actúan como HI de *F. hepatica*. A su vez estas presentan diferente susceptibilidad a la infestación.
- IV. La susceptibilidad del HI a la infestación por *F. hepatica* incide en la tasa de infestación en los HD y por ende en la endemidad regional.

## **1.7 Objetivos**

- I. Estudiar la dinámica de la infestación por *F. hepatica* en el ganado vacuno en la región con el fin de definir un patrón o tendencia de infestación si se presentase, y la incidencia de variables ambientales en el ciclo, y el impacto de la resistencia antihelmíntica.
- II. Identificar mediante técnicas moleculares los aislamientos de *F. hepatica* presentes en cada uno de los establecimientos.
- III. A. Relevar e identificar las especies de lymneidos que actúan como HI en la región endémica comprendida al sur de la provincia de Entre Ríos mediante criterios de análisis de biología molecular.  
  
B. Determinar la abundancia y estructura poblacional de los lymneidos en los diferentes orígenes de la zona de estudio.
- IV. Evaluar si existe susceptibilidad diferencial de las especies o poblaciones de lymneidos estudiadas por establecimiento a las infecciones por miracidios, expresado a través de los porcentajes de infestación hallados a campo y ante el desafío experimental con aislamientos de *F. hepatica* del mismo origen.

## **2. Objetivo I.**

### **Dinámica de infestación por *Fasciola hepatica* en el ganado.**

#### **2.1 Introducción**

El estudio de una enfermedad en una población requiere del conocimiento de las relaciones entre los organismos (hospedadores y agentes) (Thursfield, 1990), y su medio ambiente. Estas relaciones determinan la aparición de la enfermedad en el espacio y en el tiempo. Los hospedadores y los agentes forman comunidades donde también intervienen otros organismos, determinando un ecosistema. La ecología (ciencia que estudia los ecosistemas), es parte de la epidemiología, siendo esta última definida como el estudio de una enfermedad en una población y los factores que determinan su ocurrencia.

Por ello, algunos estudios epidemiológicos se sustentan en información ecológica. Hoy en día una herramienta de fácil acceso para la obtención de datos geográficos y ambientales son los sistemas de información geográfica (SIG). Los SIG permiten obtener datos ambientales, crear con ellos bases de datos, y generar interacciones para obtener nueva información (Shaw y McGuire, 2017). De esta forma, se puede asociar bases de datos temáticas a la descripción espacial precisa del objeto georreferenciado y relacionarlas entre sí. Los datos obtenidos se representan en forma vectorial (cada dato es representado por puntos, líneas o polígonos), o raster (la información está dispuesta en pequeñas celdas), y la estructura en la que son almacenados se denomina "capa". Una capa está compuesta por una base de datos (archivo.dbf), un archivo

que contiene datos espaciales georreferenciados (vectorial o *raster*) y finalmente un archivo que vincula a ambos (*shapefile*) (Rytkönen, 2017).

Estas herramientas se han aplicado en diferentes disciplinas en las últimas décadas, como el estudio de la distribución y predicción de enfermedades como malaria (Rodríguez-Morales *et al*, 2015) o infecciones como el HIV (Khademi *et al.*, 2016), entre otros ejemplos. En el caso de la fasciolosis, se ha utilizado para obtener modelos de dinámica en diferentes regiones en varios países, siendo útil para la toma de decisiones en estrategias de manejo y tratamiento (Martins *et al.*, 2011). Mediante esta metodología, se han mencionado incrementos en la tasa de infestación por *F. hepatica* en países del este de Europa (Lounnas *et al.*, 2016), posiblemente debido al cambio climático, cambios en las prácticas agrícolas y ganaderas, tanto por el uso del suelo como en movimientos de los animales (Fox *et al.*, 2011). Incluso factores de riesgo y dispersión fueron asociados mediante este recurso respecto al creciente problema de resistencia antihelmíntica en Europa (Rose *et al.*, 2015). Respecto a este problema, en *F. hepatica* se han documentado fallas post tratamiento con rafoxanide y closantel (Fairwhather y Boray, 1999). Se reportó además resistencia a triclabendazol en ovejas de Australia (Overend y Bownd, 1995), y desde entonces se ha expandido por diferentes regiones de Europa y Sudamérica (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2006; Mooney *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2013; Kelley *et al.*, 2016). En nuestro país se ha detectado resistencia al triclabendazol (Olaechea *et al* 2011), y albendazol (ABZ) (Sanabria *et al.*, 2013). Es por

ello necesario entender cómo se desarrolla la resistencia y su alcance territorial.

La epizootiología de la fasciolosis en el ganado involucra los factores que afectan la prevalencia y la intensidad de la infestación (Bessley *et al.*, 2017). Además, depende de la susceptibilidad del HD y también de la oferta de formas infectantes en el ambiente (Prepelitchi, 2009), y de factores abióticos como temperatura y humedad, que modulan la presencia y el desarrollo de los HI y del parásito. Finalmente, influyen una gran variedad de factores topográficos, biológicos y de manejo ganadero (Boray, 1985). Siendo la provincia de Entre Ríos una importante productora de carne bovina, y con un incremento sostenido en el número de ovinos, se considera pertinente estudiar la forma y dispersión espacial de esta parasitosis. Por ello, el objetivo de este capítulo es evaluar la asociación entre parámetros ambientales e indicadores de infestación animal, a fin de identificar condiciones de mayor o menor susceptibilidad para la infestación, con asistencia de SIG. Asociado a esto, se realiza una aproximación a la dispersión de la resistencia de *F. hepatica* a los antiparasitarios en la región estudiada.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Lugares de estudio**

El presente trabajo se realizó en establecimientos pertenecientes a las cuencas de los ríos Gualeguaychú (departamentos Uruguay y

Gualeguaychú), y Gualeguay (departamentos Tala y Gualeguay) (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Provincia de Entre Ríos. Se destacan el *Río Gualeguay* y *Gualeguaychú*, y cuencas homónimas.

La cuenca del río Gualeguay ocupa el 30% del territorio entrerriano, compuesta por una gran variedad de suelos fértiles. El río homónimo tiene un régimen regular de crecientes desde marzo hasta julio, produciendo inundaciones. El principal componente edafológico son las arcillas, lo que favorece el escurrimiento. Se divide en dos ecorregiones: mesopotamia



hacia el norte (90%), con relieves bajos, ondulaciones, drenaje pobre e indefinido, y de pastizales húmedos (10%) (Daniele y Natenzon, 1994).

La cuenca del río Gualeguaychú se encuentra al sudeste de la provincia ocupando una superficie de 6690 km<sup>2</sup>, sus suelos son arcillosos, y se encuentra dentro de la ecorregión de pastizales húmedos. Su relieve es suavemente ondulado.

Los seis establecimientos donde se realizaron los muestreos se ubican en los siguientes departamentos (Figura 1.4): A) Departamento **Tala**, que contiene 158.132 cabezas de ganado (FUCOFA, 2015). Dentro de éste se encontraron los establecimientos “Los Castores” y “Las Casuarinas”. B) Departamento de **Gualeguay**, con 285.935 animales (FUCOFA, 2015). Se trabajó en el establecimiento “San Julián”. C) Departamento de **Uruguay**, con 251.144 cabezas, donde se muestrearon los establecimientos “El Cerro” y “La Yanera”. D) Departamento de **Gualeguaychú**, que cuenta con 423.353 cabezas, siendo este el más alto de la provincia. Allí se trabajó en el establecimiento “La Torcaza”. La ubicación de los establecimientos se grafica en la figura 2.2.

Los establecimientos presentaron heterogeneidad de razas, carga animal y sistemas de manejo, siendo un denominador común la categoría representada (vacas), y el pastoreo extensivo sobre praderas naturales.

A continuación, se detallan las particularidades de cada establecimiento:

a. Establecimiento “Los Castores” (32°23'1.40” S; 59° 6'21.40” O): se ubica a 7km de la ciudad de Rosario del Tala, pose 1200 Ha y gran parte del

mismo son bañados destinados a la ganadería. Está limitado hacia el sur por el arroyo “La Ollita” y atravesado por arroyos temporarios. El predio contiene 200 bovinos de raza Hereford y sus cruzas, y realizan cría bovina. (Figura 2.2)

b. Establecimiento “Las Casuarinas” (32°28'21.38” S; 59° 6'47.86” O): se sitúa a 22 km de Rosario del Tala, cercano al paraje “Las Guachas”. Posee 298 Ha, de las cuales 60 Ha son ocupadas por una laguna. Contiene además arroyos temporarios, y en parte es recorrido por el río Gualeguay, por lo que, en épocas de crecida, gran proporción del campo se inunda. Cuenta con 198 cabezas de cría bovina extensiva, principalmente de la raza Hereford y cruzas. Carece de instalaciones (mangas, corrales, aguadas), y asesoramiento profesional (Figura 2.2).

c. Establecimiento “San Julián” (32°51'59.11” S; 59°26'51.46” O): está situado en el departamento Gualeguay, al norte de la ciudad homónima, próximo al paraje Lazo (Figura 2.2). Posee 1200 hectáreas, y se encuentra limitado hacia el noroeste por el arroyo Clé, el cual tributa al río Gualeguay, y en épocas de lluvia abundante, desborda inundando en buena parte los potreros donde se encuentran los animales. Desarrolla producción bovina (aproximadamente 500 cabezas de raza Hereford, Aberdeen Angus y cruzas) y ovina.

d. Establecimiento “El Cerro” (32°35'0.70” S; 58°29'53.00” O): contiene 1255 Ha, de las cuales 300 Ha son destinadas al ganado y el resto se destina a agricultura. Limita hacia el suroeste por el río Gualeguaychú, por lo que las zonas cercanas a este son bajas e inundables, estando, además,

circunscripto por numerosos bañados y acúmulos de agua temporarios. Cuenta con 120 bovinos, de los cuales 70 pertenecen a un plantel Aberdeen Angus.

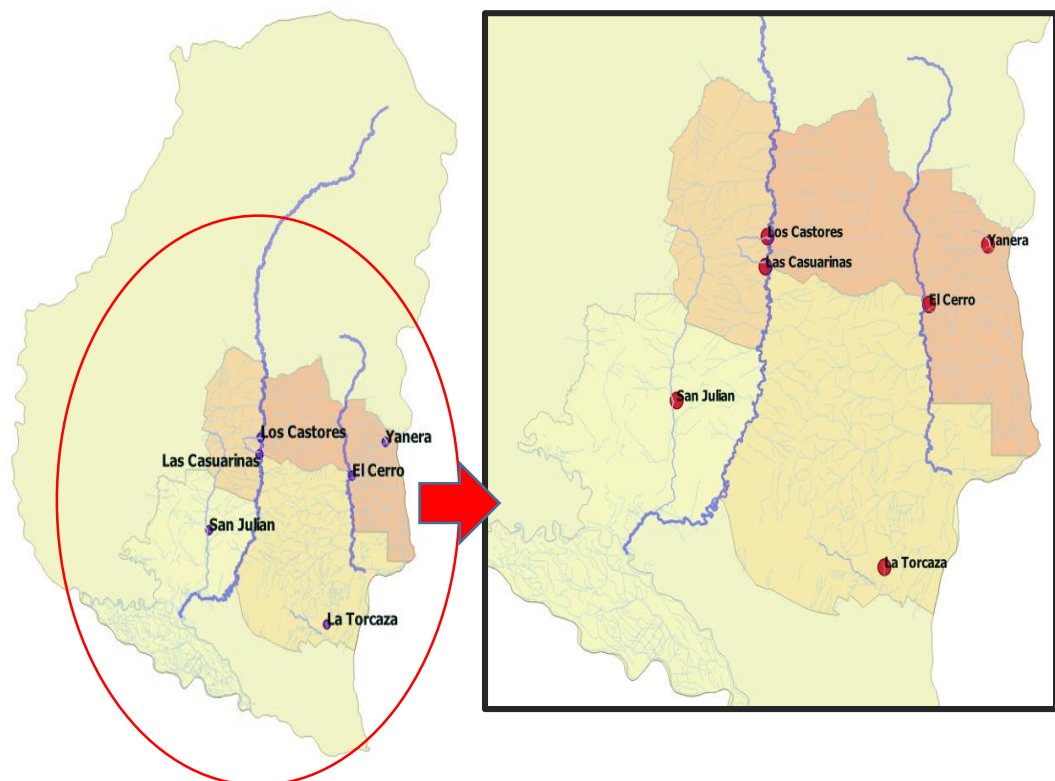
e. Establecimiento “La Yanera” (32°24’29.20” S; 58°16’34.80” O): presenta una superficie de 160 Ha, es atravesado por el arroyo Colman y gran parte del establecimiento está constituido por bañados. Solo se dedica a la producción bovina (cría e invernada), con un total de 105 animales británicos cruza. No se realizan de rutina controles sanitarios ni mejoramiento productivo.

f. Establecimiento “La Torcaza” (33°21’25.90” S; 58°39’57.14” O): cuenta con una superficie de 400 Ha, siendo la mayor parte bajos destinados a cría bovina. Limita hacia el sur con el arroyo “Ñancay”. Cuentan con 300 animales de raza Hereford, asesoramiento sanitario, y se desparasita regularmente con albendazol e ivermectina. Además, se realizan tratamientos para *F. hepatica*, utilizando triclabendazol dos veces por año, en otoño y primavera. Anualmente se vacuna contra hemoglobinuria bacilar y carbunco, más la aplicación de cobre inyectable 3 veces al año.

#### 2.2.2. Trabajos de campo y laboratorio

Los muestreos se realizaron entre marzo de 2013 y septiembre de 2015, en forma trimestral. No obstante, las inundaciones registradas en 2014 dificultaron el acceso y modificaron los intervalos de muestreo en algunos establecimientos.

En cada muestreo, se colectó, al azar, materia fecal de forma individual a 20 vacas adultas. Las muestras se identificaron individualmente y se trasladaron refrigeradas hasta el laboratorio (CEDIVE, Facultad de Cs. Veterinarias, UNLP). Se procesaron 2 gramos de materia fecal de cada animal, mediante la técnica de filtración por tamices y sedimentación (Ueno y Concalves, 1988). El sedimento fue coloreado con azul de metileno al 1% y se observó bajo lupa estereoscópica a 30 aumentos. De esta forma, los huevos de *F. hepatica* se diferencian por su color ámbar de los de *Paramphistomum* spp., que son transparentes. De cada muestra se calculó el número de huevos por gramo de materia fecal (HPG). En base a estos resultados se determinaron el promedio de HPG para cada muestreo y la prevalencia ( $\text{positivos a } F. hepatica / \text{total} \times 100$ ).



**Figura 2.2.** Ubicación de los establecimientos estudiados dentro de la provincia de Entre Ríos.

### 2.2.3. Obtención de datos climáticos, geográficos y confección de archivos SIG

Los establecimientos se georreferenciaron *in situ* utilizando GPS (Garmin® eTREx 20). Los datos climáticos fueron recopilados de los centros meteorológicos más cercanos a los establecimientos, los cuales fueron cedidos por la Dirección de Hidráulica de la Provincia de Entre Ríos (<http://www.hidraulica.gob.ar>). De esta forma se compilaron valores mensuales de temperaturas mínimas, medias y máximas, precipitaciones, déficit y exceso hídrico, tanto para el mes en curso, como para dos meses y cuatro meses antes de la fecha de muestreo de los años 2013 al 2015. La comparación de datos climáticos y ambientales anteriores con cada evento de muestreo se realizó para verificar la incidencia del período prepatente en la prevalencia. También se obtuvieron datos de tipo de suelo mediante acceso a bases de datos abiertas (<http://geointa.inta.gov.ar>).

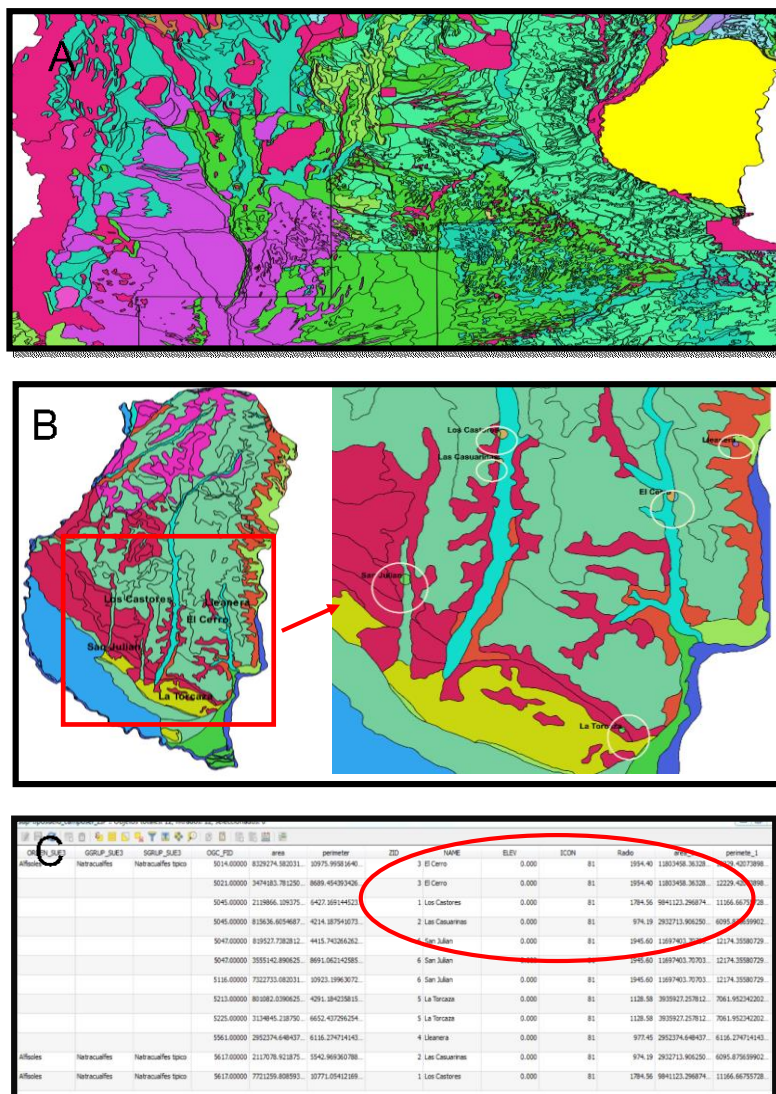
Para la confección de SIG se empleó el programa Qgis versión 2.18, de acceso libre (<https://www.qgis.org>). En este programa se cargó la capa “suelos de Argentina” (*shapefile* de la página de GEOINTA - <http://geointa.inta.gov.ar>), y una capa de la provincia de Entre Ríos (*provincia\_ER*). A partir de estas dos se generó la capa “tipo de suelos de Entre Ríos” (*tipo\_sueloER*). Sobre esta se creó una capa de puntos con las coordenadas de los establecimientos (*puntos\_campos*). El sistema de referencia de coordenadas fue EPSG 4357-POSGAR 2007/Argentina 5. A partir de la capa *puntos\_campos* se definieron zonas de influencia (*buffers*), proporcionales a las hectáreas de cada establecimiento, originando así otra

capa denominada “buffer\_campos”. Finalmente, se confeccionó una nueva capa con los tipos de suelos de los establecimientos que se relacionó con la anterior, y se denominó “tipo\_suelos\_campos”.

De la capa “tipo\_suelo\_campos” se obtuvieron los datos del área de cada clase de textura de suelo (Figura 2.3). Conociendo el área total de cada establecimiento, obtenidos a partir del radio, se obtuvo la proporción de cada textura de suelo por establecimiento.

Para evaluar la incidencia de la temperatura ( $T^{\circ}$ ), se generó la variable dicotómica denominada “periodo del año”, con dos resultados posibles: baja temperatura o alta temperatura. Se consideró “periodo de temperatura baja” a aquellos meses cuya diferencia de temperatura máxima menos temperatura máxima de 4 meses antes resultó menor a cero, indicando un descenso de la temperatura. Resultaron entonces meses de baja temperatura: abril (4), mayo (5), junio (6), julio (7) y agosto (8). Por otra parte, se consideró “periodo de temperatura alta” a aquellos meses cuya diferencia de temperatura máxima actual menos temperatura máxima 4 meses antes resultó mayor a cero, lo cual manifiesta un ascenso de la temperatura. Resultaron entonces meses de alta temperatura: septiembre (9), octubre (10), noviembre (11), diciembre (12), enero (1), febrero (2) y marzo (3). De esta forma se recategorizaron a los meses del año en los cuales se realizaron muestreos, lo cual permite agrupar las mediciones, y compararlas entre grupos de alta o baja temperatura.

**Figura 2.3** Imágenes obtenidas por sistemas de información geográfica (programa Qgis), para la región sur de Entre Ríos.



A) Capa de tipo de suelos de Argentina, con selección de la provincia de Entre Ríos (fondo amarillo), B) capa "Buffer\_campos" de los establecimientos, conteniendo el tipo de suelos que estos presentan C) Captura de pantalla de tabla de atributos de tipo de suelo de los establecimientos.

Variables Epidemiológicas: se calculó la prevalencia (número de animales parasitados respecto al total de animales muestreados), y huevos por gramo (HPG) promedio, para cada fecha de muestreo.



#### 2.2.4. Evaluación del estado de resistencia a drogas

Para determinar cuál es el estado de resistencia regional a los fasciolicidas se realizó inicialmente un test de reducción del recuento de huevos (TRRH) en los establecimientos San Julián, Los Castores, El Cerro y La Torcaza. No fue posible su realización en los establecimientos La Yanera (Depto. de Uruguay), y Las Casuarinas (Depto. de Tala), por no contar con personal para el encierro de la hacienda en las fechas necesarias.

Para realizar el TRRH, se tomaron muestras individuales de materia fecal de sesenta bovinos de cada uno de los establecimientos, categoría vaca adulta, bajo la condición de presentar más de cinco HPG de *F. hepatica*. Los ensayos de resistencia se realizaron entre marzo y julio de 2013, dependiendo de las fechas coordinadas para muestreos y disponibilidad de cada campo para encerrar los animales. Los animales elegidos fueron agrupados de forma homogénea en base a sus conteos de huevos de *F. hepatica*, y dependiendo del tratamiento que recibieron (día 0), se asignaron a los siguientes grupos:

G1: tratamiento con albendazol (ABZ), a 10mg/kg, por vía oral (n=15); G2: tratamiento con triclabendazol (TCBZ), a 10 mg/kg, por vía oral (n=15); G3: tratamiento con closantel (CSTL), a 15 mg/kg, vía subcutánea (n=15); G4: grupo sin tratamiento (n=15) todos los tratamientos se realizaron a dosis única. Posteriormente se tomaron muestras fecales el día +7 y +21 (postratamiento). Las muestras fueron analizadas en laboratorio (CEDIVE-FCV-UNLP), por la técnica descrita por Ueno y Goncalves (1998).



### 2.2.5. Análisis estadístico

Para la comparación de proporciones poblacionales, se utilizó prueba de Z. Para la comparación de medianas poblacionales para variables que no siguen una distribución normal perteneciente a muestras independientes, se emplearon las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney (2 grupos) y Kruskal-Wallis (más de dos grupos), seguido por test de Dunn (post-hoc). La inclusión en uno u otro análisis se realizó de acuerdo al resultado del test de normalidad de Shapiro-Wilks. En el caso de variables categóricas, los datos fueron comparados por Chi<sup>2</sup>, con posterior estimación del odds ratio. Las correlaciones entre las variables textura de suelo y prevalencia, fueron determinadas mediante correlación de Pearson, o análisis no paramétrico de Spearman, de acuerdo a su distribución. En todos los casos, se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor o igual a 0,05, y tendencia entre 0,1 y 0,05.

Para determinar la eficacia de cada una de las drogas evaluadas, se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ de eficacia: } \frac{\text{HPG G4} - \text{HPG G1/2/3 (día +21)}}{\text{HPG G4}} \times 100$$

Los grupos se compararon estadísticamente mediante prueba de T, luego de una transformación logarítmica (Olaechea *et al.*, 2011).

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas IBM SPSS Statistics ver. 23 (IBM Corp.), InfoStat ver. 2017 (UNC, Argentina) y GraphPad Prism 6.0 (GraphPad software, USA).

### **2.3 Resultados**

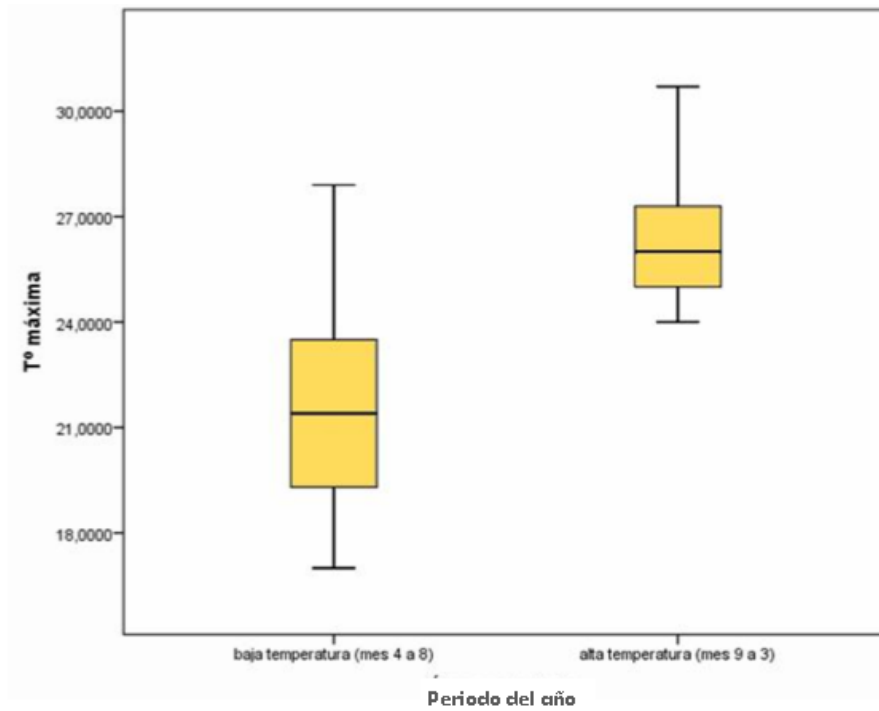
El promedio de T° (desvío estándar), máxima, mínima y media, respectivamente, fue de 26°C (2,7) 14°C (2,3), y 19,7°C (2,3) para el periodo de alta temperatura (figura 2.4) y 21°C (2,9), 10,5°C (2,3), 15.5°C (2,5) para el de baja temperatura (figura 2.5). El promedio de las precipitaciones (desvío estándar), fueron de 120,5 mm (68), y 122,7 mm (221), para los períodos de alta y baja temperatura, respectivamente (figura 2.6).

El promedio de la prevalencia de los establecimientos de cada cuenca, así como la comparación de prevalencias entre cuencas, departamentos y establecimientos dentro de una misma cuenca, se detallan en la figura 2.7. Al comparar las prevalencias promedio, no se hallaron diferencias entre las cuencas Gualeguay y Gualeguaychú ( $p=0,24$ ), sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los establecimientos de Gualeguay y Tala ( $p=0,001$ ) (pertenecientes a la cuenca río Gualeguay), y entre establecimientos de las localidades C. del Uruguay y Gualeguaychú. ( $p=0,001$ ) (pertenecientes a la cuenca del río Gualeguaychú) (Tabla 2.1, Figura 2.7).

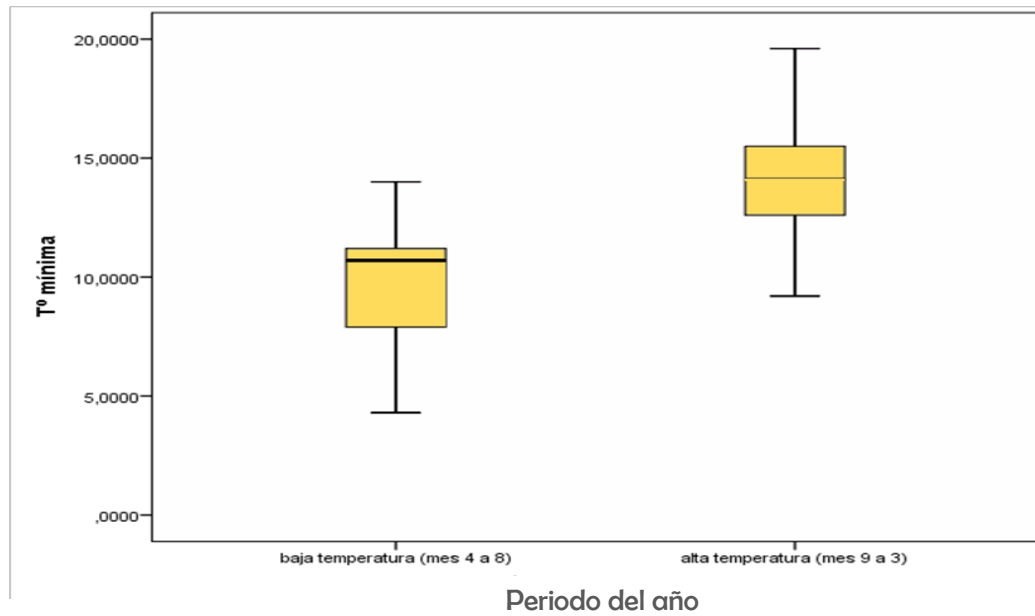
Se halló asociación positiva entre las variables prevalencia y temperatura, ( $p < 0,001$ ), (Tabla 2.2), indicando que en períodos de alta temperatura se incrementa en promedio 3 veces la probabilidad de hallar animales positivos, respecto a la probabilidad de hallarlos en período de baja temperatura (OR 2,86; IC95% 1,87-3,85).

Para los valores de HPG, solo se halló una tendencia en la diferenciación entre establecimientos, ( $p=0.056$ ).

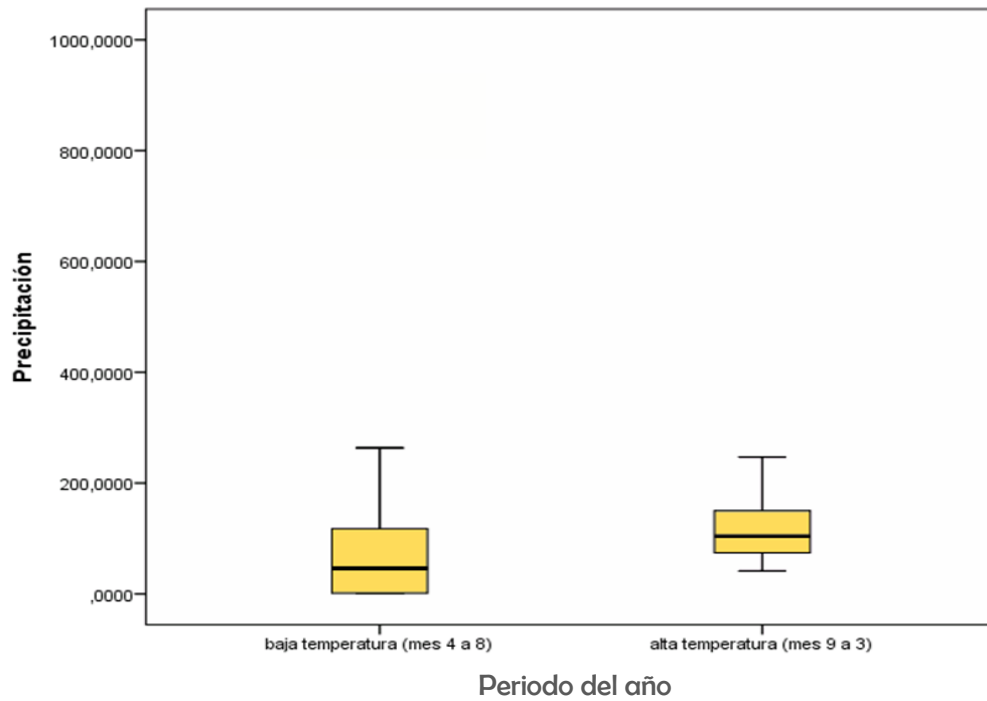
**Figura 2.4.** Distribución de temperaturas máximas en períodos de baja y alta temperatura



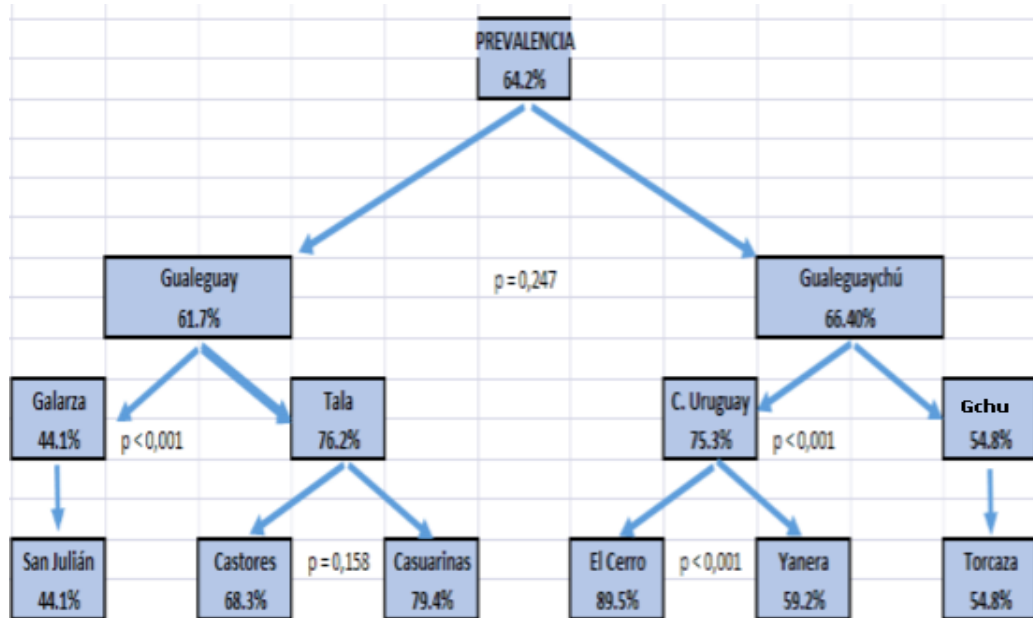
**Figura 2.5.** Distribución de temperaturas mínimas en períodos de baja y alta temperatura



**Figura 2.6.** Distribución de precipitaciones en períodos de baja y alta temperatura.



**Figura 2.7.** Comparación de prevalencias generales (promedio de todos los muestreos), a nivel de cuencas, localidades y establecimientos de cada localidad.



**Tabla 2.1.** Valores de  $p$  para la comparación de prevalencias de *F. hepatica* en bovinos, entre establecimientos, a través de la prueba de  $z$ .

Localidad	San					
	Castores	Casuarinas	El Cerro	Julián	Torcaza	Yanera
Castores	1	0.193149	0.005203	0.010713	0.147067	0.424327
Casuarinas	0.193149	1	0.072483	0.000000	0.000127	0.004502
El cerro	0.005203	0.072483	1	0.000000	0.000000	0.000009
San Julián	0.010713	0.000000	0.000000	1	0.096937	0.041301
Torcaza	0.147067	0.000127	0.000000	0.096937	1	0.560360
Yanera	0.424327	0.004502	0.000009	0.041301	0.560360	1

**Tabla 2.2.** Comparación de prevalencias entre períodos de temperatura baja (abril a agosto) y temperatura alta (septiembre a marzo).

		Negativo	Positivo	TOTAL
<b>Baja temperatura (mes 4 a 8)</b>	N	120	130	250
	%	48.00%	52.00%	100%
<b>Alta temperatura (mes 9 a 3)</b>	N	76	221	297
	%	25.60%	74.40%	100 %
<b>Total</b>	N	196	351	547
	%	35.80%	64.20%	100%

**Tabla 2.3.** Recuento de huevos por gramo (HPG) de *F. hepatica* por establecimiento.

Establecimiento	Promedio HPG	D.E.	Min.	Max.
Castores	3.2	1.7	1.7	5
Casuarinas	13.0	10.8	2.3	23.9
El Cerro	16.9	6.7	8.1	24.9
San Julián	8.9	17.8	0	48.9
Torcaza	6.8	7.1	0.3	16.5
Yanera	6.7	5.4	0.3	14.9

D.E.: desvío estándar; Max.: valor máximo; Min.: valor mínimo.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables climáticas T° máxima, T° mínima, T° media, precipitaciones, exceso y déficit hídrico, en relación a la prevalencia y HPG medidos en el mes en curso, a los dos y a los cuatro meses antes. Sin embargo, se halló asociación entre la prevalencia y la temperatura máxima de 2 meses antes ( $p=0,041$ ). En la tabla 2.5 se muestran las proporciones de tipos de suelos que presenta cada establecimiento, obtenido de la capa tipos\_suelos\_campos (tabla 2.4)

En este sentido, se halló correlación significativa entre las variables prevalencia y tipo de suelo franco ( $R= 0,81$ ;  $p=0,03$ ). en la figura 2.10 se muestra la distribución de la textura de suelo franco en la provincia de Entre Ríos.

**Tabla 2.5.** Atributos de la capa tipos\_suelos\_campos obtenida por SIG.

Establecimiento	ORDEN_SUE1	TEXT_BS1	DRENAJE_S1	ALCALIN_S1	Radio(m)
Los Castores	Molisoles	Franco arcillo limos	Moderado	No sodico	1784.56
Los Castores	Inceptisoles	Franca	Pobre	Muy fuerte	1784.56
Las Casuarinas	Molisoles	Franco arcillo limos	Moderado	No sodico	974.19
Las Casuarinas	Inceptisoles	Franca	Pobre	Muy fuerte	974.19
El Cerro	Inceptisoles	Franca	Pobre	Muy fuerte	1954.40
El Cerro	Vertisoles	Arcillo limosa	Moderado	No sodico	1954.40
Yanera	Molisoles	Franco arcillo areno	Imperfecto	No sodico	977.45
La Torcaza	Molisoles	Franco arcillo limos	Moderado	No sodico	1128.58
La Torcaza	Alfisoles	Franco arcillo limos	Imperfecto	Muy fuerte	1128.58
San Julián	Molisoles	Franco arcillo limos	Moderado	No sodico	1945.60
San Julián	Molisoles	Franco arcillo limos	Moderado	No sodico	1945.60
San Julián	Entisoles	Franco arcillo limos	Pobre	No sodico	1945.60

Referencias: **orden\_sue1**, grupo de suelo principal según Soil Taxonomy; **text\_bs1**, textura del suelo principal; **drenaje\_s1**, drenaje del suelo principal; **alcalin\_s1**, alcalinidad del suelo principal. **Radio**: valor en metros obtenido a partir del área de la capa de buffers, de acuerdo a la superficie de cada establecimiento.

**Tabla 2.6.** Proporción porcentual de tipo de suelo de los establecimientos estudiados, calculada mediante SIG (capa tipo\_suelos\_campos).

Establecimiento	Franco arcillo limoso	Franco	Arcillo limoso	Franco arcillo arenoso
El Cerro	0	71%	29%	0
Yanera	0	0	0	100%
Torcaza	0	0	100%	0
Casuarinas	28%	72%	0	0
Castores	22%	78%	0	0
San Julián	0	0	100%	0

**Figura 2.8.** Disposición de textura de suelo franco en Entre Ríos, en relación a los establecimientos estudiados.

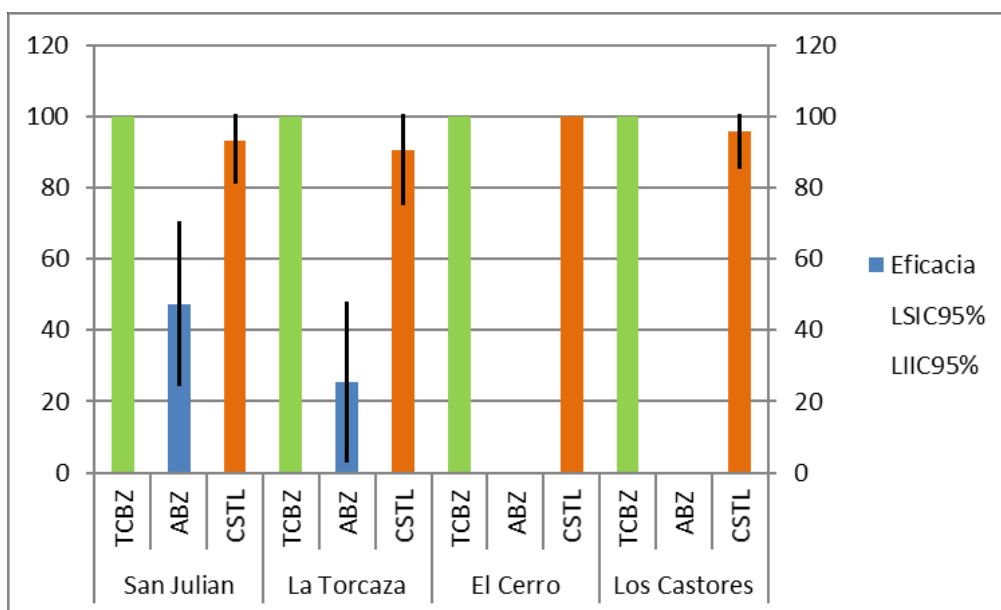


#### Evaluación de la resistencia antihelmíntica

Tanto TCBZ como closantel mostraron niveles de eficacia satisfactorios (figura 2.11). No obstante, en los cuatro establecimientos se observó resistencia a ABZ, a dosis fasciolicida estándar para bovinos (10 mg/kg).



**Figura 2.9.** Eficacia de triclabendazol, albendazol y closantel en los establecimientos estudiados.



LSIC95% LIIC95%: límites superior e inferior, respectivamente, para el intervalo de confianza del 95% (líneas negras).

## 2.4 Discusión

Durante el periodo de estudio (2013-2015), los bovinos mostraron parasitismo por *F. hepatica* en cada muestreo y en todos los establecimientos. Los resultados de prevalencias superaron siempre el 40%, lo que confirma la endemidad de esta parasitosis en la región.

Las diferencias en la prevalencia observada entre los establecimientos podrían adjudicarse en parte al manejo aplicado, algunos de ellos realizan control farmacológico estratégico mientras que otros no lo realizan o lo hacen solo cuando les es factible operativamente.

También se observó incidencia de la temperatura en la prevalencia, pese a no observarse una estacionalidad marcada. No obstante, en los periodos

de altas temperaturas (septiembre a marzo) la probabilidad de encontrar alta proporción de animales infestados es casi 3 veces superior a las épocas de baja temperaturas (abril- agosto). Esto debería considerarse al planificar estrategias de control farmacológico y de manejo.

La falta de asociación significativa entre otras variables climáticas y la infestación en el ganado no permitió determinar períodos de mayor riesgo. Pese a ello, la persistencia de excesos hídricos ya sea como producto de precipitaciones o crecidas de cursos de agua, posiblemente influya en la infestación en los animales a lo largo del año, y en el mantenimiento de la elevada tasa de infestación.

La utilización de SIG permitió asociar el tipo de suelo a la prevalencia de esta parasitosis, indicando una tendencia a presentar mayor infestación por *F. hepatica* en aquellos establecimientos que presentan mayor proporción de textura de suelo franco. En concordancia, los tres establecimientos con mayor proporción de suelo franco (tabla 2.6.), fueron los que presentaron los valores más altos de prevalencia en promedio (figura 2.9.). A su vez, la prevalencia de estos establecimientos fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ), comparada con establecimientos de la misma cuenca con menor proporción de suelo franco (figura 2.9.; tabla 2.1.). Estos suelos se caracterizan por un drenaje pobre, permanecen saturados la mayor parte del tiempo y con exceso de humedad superficial (Arauz, 2011), siendo estas condiciones fundamentales para la presencia de los HI (Olaechea *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2012). Similares hallazgos fueron mencionados en Bélgica, donde establecimientos con textura de suelos franco presentaron

mayor presencia de *Galba truncatula*, respecto a otros tipos de suelo (Charlier *et al.*, 2011). Puede asumirse un mayor riesgo para el desarrollo de la fasciolosis en establecimientos que contengan este tipo de suelos, el cual parece proporcionalmente mayor al sur que al norte de la provincia (figura 2.8). Además, su distribución presenta un patrón vinculado a los principales ríos que dan nombre a las cuencas (figura 2.2y 2.8.).

Sin embargo, la proporción de los diferentes tipos de suelo puede ir modificándose con el transcurso de los años, lo cual puede condicionar el ambiente para el desarrollo de los HI, y así ampliar o reducir la oferta de MTC. La incorporación de nuevas variables podría ampliar este análisis y agregar precisión a las estimaciones.

En cuanto a la eficacia antihelmíntica, detectamos que la resistencia al ABZ es frecuente en los bovinos de la región de estudio, en concordancia con observaciones previas en ovinos de la misma zona (Sanabria *et al.*, 2013). Varias circunstancias pueden haber llevado a esta situación, entre ellas la subdosificación de ABZ (5 mg/kg), para el tratamiento de nematodos gastrointestinales (Beesley *et al.*, 2017, Sanabria *et al.*, 2013), contribuyendo así a una alta presión de selección de aislamientos de *F. hepatica* resistentes a dicha droga. Además, es llamativa la difusión de este fenómeno en la zona, contando con pocos antecedentes de este tipo a nivel mundial. En Perú, se reportó una situación similar donde se detectó resistencia a TCBZ en cuatro establecimientos analizados (Rojas Moncada *et al.*, 2013). La generalización de este fenómeno a nivel local hace suponer la existencia de otra vía de difusión. Posiblemente, el desplazamiento de

los HI infectados con formas larvarias ABZ-resistentes, mediante el ascenso y descenso de los numerosos cursos de agua, pueda ser un factor a analizar. Finalmente, la alta eficacia observada frente a TCBZ, pone de manifiesto que, pese a pertenecer al mismo grupo farmacológico, la halogenación de la molécula de TCBZ implica mecanismos de acción diferentes a los de ABZ.

Se sabe de la afinidad de los bencimidazoles carbamatos a la  $\beta$ -tubulina microtubular como blanco principal, mientras que se ha postulado que mecanismos de detoxificación celular, como los mediados por glicoproteína P, se encontrarían exacerbados en aislamientos de *F. hepatica* resistentes al TCBZ (Kotze *et al.*, 2014). Los aislamientos obtenidos a partir de estos trabajos permitirán profundizar en el conocimiento de resistencia antihelmíntica en *F. hepatica*, en ensayos subsecuentes.

### **3. Objetivo II**

#### **Análisis molecular de la estructura poblacional de *Fasciola hepatica* en el sur de la provincia de Entre Ríos**

##### **3.1 Introducción**

La genética de poblaciones estudia las relaciones entre las predicciones basadas en la herencia mendeliana, y las observaciones empíricas realizadas a través de la medición de genotipos y frecuencias alélicas (Hamilton, 2009). Para realizar estas observaciones, se emplean marcadores genéticos que intentan explicar los fenómenos evolutivos, distribución y características dentro de una población y entre poblaciones. Estas poblaciones, están sujetas a cambios evolutivos en los que subyacen cambios genéticos, y estos están influidos por factores como la selección natural, la deriva y flujo genéticos, la mutación y la recombinación (Cabrero y Camacho, 2002). De acuerdo a la ley de equilibrio de Hardy Weinberg, en una población suficientemente grande, apareada al azar, y no sujeta a variaciones por selección, mutación o migración, las frecuencias génicas permanecen constantes de una generación a otra (Stern, 1943). A partir de esta “hipótesis de nulidad”, la incidencia de cambios y movimientos poblacionales producirá desvíos de este equilibrio y, por ende, nuevas variantes genéticas.

Respecto a ello, Sewall Wright (1943), postuló que los organismos están formando poblaciones discretas (modelo de islas) y que se diferencian de las otras poblaciones por mutaciones o deriva genética (frecuencias

alélicas remanentes luego de sucesivas recombinaciones en una población). De forma opuesta, Wright (1965), planteó el modelo de aislamiento por distancia, mediante el cual se forman poblaciones con distribución continua de acuerdo a la distancia física entre padres e hijos, y la posibilidad de intercambio genético está sujeta a la vecindad poblacional (Planter, 2007).

Para *F. hepatica*, la diferenciación de poblaciones puede relacionarse con interacciones hospedador-parasito, e incluso con la fijación a nivel poblacional de ciertas características, como la expansión de la resistencia a antiparasitarios (Vilas *et al.*, 2012). Por ejemplo, Elliot *et al.* (2014), hallaron menor polimorfismo en aislamientos de campo susceptibles a TCBZ, en comparación con otros aislamientos TCBZ - resistentes, empleando marcadores mitocondriales.

*Fasciola hepatica* alcanza la madurez sexual en los conductos biliares del hospedador definitivo, donde se reproducen por autofecundación, fecundación cruzada e incluso partenogénesis (Ichikawa e Itagaki, 2012); esto, sumado a la multiplicación asexual dentro del HI, facilita un alto flujo de genes, y así, el potencial para promover altos niveles de variabilidad genética dentro de la población, lo que influye en la transferencia de genes relacionados a las diferentes características (Hurtrez-Bousses *et al.*, 2004; Vilas *et al.*, 2012).

Además, la presencia de múltiples hospedadores definitivos existentes podría conducir a procesos de selección de determinadas poblaciones de

*F. hepatica*, influidas por los hábitos y comportamiento de las diferentes especies, resultando en una sub-estructuración de la población, y diversidad genética en distintos hospedadores y localidades geográficas (Cwiklinsky *et al.*, 2015).

Para estudiar la estructura genética se han utilizado como marcadores, genes del ADN mitocondrial (ADNmt), como los codificantes para citocromo oxidasa I (COI) y nicotinamida adenina dinucleótido I (NADI), entre otros (Itagaki *et al.*, 2005; Elliot *et al.*, 2014; Amer *et al.*, 2011). Los marcadores ADNmt son los mayormente utilizados en la construcción de mapas filogenéticos, debido a que presentan polimorfismo interespecífico, y evolucionan más rápido que el ADN nuclear (Hebert *et al.*, 2003). Se ha propuesto un sistema de identificación global de especies basado en el Gen COI, denominado "*barcode of life*", disponible en [www.barcodinglife.com](http://www.barcodinglife.com) (Reyna, 2013). Sin embargo, los marcadores ADNmt tienen algunas limitaciones, debido a la ausencia de recombinación, siendo esto de escasa utilidad para inferir dispersión genética entre subpoblaciones (Vilas *et al.*, 2012). Es entonces necesario, en algunos casos, el empleo de marcadores de mayor polimorfismo. En este sentido, una opción son los marcadores microsatélites o secuencias repetidas en tándem (SRT) (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004; Dar *et al.*, 2011, 2013; Vilas *et al.*, 2012; Cwiklinsky *et al.*, 2015). Los SRT son secuencias cortas repetidas de bases, situadas al azar en el genoma eucariota (Toth *et al.*, 2000). Por su mayor polimorfismo son valorados para evaluar la diversidad genética y la estructura de poblaciones y subpoblaciones (Dar *et al.*, 2011; Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004). Un

ejemplo de su empleo masivo es su utilización en definición de relaciones parentales en prácticamente cualquier especie (Aykanat *et al.*, 2014; Cosenza *et al.*, 2015; Glazewska *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta lo mencionado, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar mediante diferencias genotípicas los aislamientos de *F. hepatica* presentes en los establecimientos, mediante el auxilio de marcadores SRT y ADNmt.

### **3.2. Materiales y métodos**

Se recuperaron 104 ejemplares adultos de *F. hepática* a partir de necropsias realizadas a cuatro bovinos de los establecimientos: San Julián, Los Castores, Las Casuarinas y La Torcaza. Los mismos fueron recolectados de vesícula y vías biliares, se depositaron en recipientes identificados conteniendo solución fisiológica, y fueron trasladados al laboratorio refrigerados.

Una vez en el laboratorio, se lavaron tres veces con solución fisiológica y se preservaron en etanol 70 hasta su utilización.

Para la extracción de ADN se empleó la parte posterior de los ejemplares, se secaron entre papel tipo *tissue* y se inició su digestión por inmersión del fragmento en 200µl de chelex al 5 % (Estoup y Martin, 1996), en placa de 96 pocillos. Posteriormente se le incorporaron 5µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich, USA), y se incubó a 56 °C por 6 horas, con agitaciones periódicas en vortex, y finalmente las muestras fueron incubadas a 95°C por 10 minutos. El digesto fue homogeneizado y centrifugado a 10.000 g por 10



segundos, y se tomaron 100 µl de sobrenadante, para ser diluido en agua ultrapura (proporción 1:10) y almacenado a -20°C para su posterior utilización.

Se emplearon 9 marcadores SRT (Hurtrez–Boussès *et al.*, 2004; Cwiklinsky *et al.*, 2015) (tabla 3.1), para evaluar la diversidad genética de *F. hepatica* de los establecimientos “San Julián” (departamento Gualeguay) (n=25), “La Torcaza” (departamento Gualeguaychú) (n=23), “Las Casuarinas” (departamento Tala) (n=31), y “Los Castores” (departamento Tala) (n=25). No se pudo obtener ejemplares adultos de los establecimientos “Yanera” y “El Cerro” pertenecientes al departamento de Uruguay.

El ADN extraído se diluyó en una proporción 1:10 en agua ultrapura. Los loci fueron amplificados a partir de 4µl de ADN diluido, en 20µl de volumen de reacción, conteniendo 2µl de buffer 10x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA) 2 mM dNTPs (Invitrogen/Life Technologies, USA) 5-10 Pmol de cada primer y 1,3 U de Taq polimerasa (Promega, USA). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MPI (Argentina), y consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* a temperatura específica para cada *primer* (tabla 3.1) por 30 segundos, elongación a 72°C por 30 segundos, y elongación final de 72°C por 10 minutos.

La presencia de productos de PCR del peso molecular esperado fue evidenciada por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, comparación con

un *ladder* de 50 pb, empleando SYBRSafe (Invitrogen, USA), y se observaron en transiluminador azul (Safe Imager, Invitrogen, USA).

Posteriormente se genotipificaron el total de las muestras positivas, utilizando 3 µl de productos de PCR diluidos (1: 100) con 15 µl de Hi-Di Formamide y 0.2 µl de GeneScan-500 LIZ Size Standard y se analizaron en un analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Los tamaños de alelos se estimaron utilizando el software GeneMapper® v. 4.0 (Applied Biosystems). El tamaño de los microsatelites fue analizado mediante el software GENESCAN (Applied Biosystems, USA). Tanto los procesos de secuenciación como su análisis se realizaron en el laboratorio *Maladies Infectieuses et Vecteurs: Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle* (MIVEGEC) del *Intitut de Recherche pour le Devéleppement* (IRD) en Montpellier, Francia.

A partir de la información obtenida, se analizaron: números de alelos (N), heterogeneidad observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ), coeficiente de endogamia intrapoblacional ( $F_{is}$ ) y tasa de autofecundación (S), calculada como  $S = (2 F_{is}) / (1 + F_{is})$  (Hartl y Clark, 1997). Se usó el índice de fijación ( $F_{st}$ ) para estimar la diferencia de frecuencias alélicas entre poblaciones, indicados como promedio  $\pm$  DS. Los datos fueron analizados utilizando el programa GenoDive versión 2.0b23 (Meirmans y Tindereen, 2004). La frecuencia genotípica se determinó utilizando GENOPOP 4.2.1 (Rousset, 2008, disponible en <http://Kimura.univ-montp/russet/genopop.htm>)

Para el análisis filogenético se utilizó el marcador molecular COI del ADNmt, para lo cual se extrajo ADN de 40 adultos de *F. hepatica* (10 por cada establecimiento analizado), utilizando un kit de extracción comercial (Zymo Research. Quick-g DNA Miniprep). La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl , conteniendo 5 µl de ADN molde; 1,25 U de Taq polimerasa (Promega, Madison, USA), 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen/Life Technologies, USA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl de buffer, 0,1 µM de los primers Ita 8 (5'-ACGTTGGATCATAAGCGTGT-3'), e Ita 9 (5'-CCTCATCCAACATAACCTCT-3') (Ichikawa e Itagaki; 2012). Dieciseis de los amplicones obtenidos (cuatro por establecimiento de origen) fueron purificados con un kit comercial (Zymo Research. DNA Clean & Concentrator Kit, Zymo Research, USA) y enviadas para su secuenciación a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA Castelar. Las secuencias fueron analizadas y alineadas mediante los programas Chromas 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd, Australia), y Clustal Omega (EMBL-EBI, Reino Unido). Luego fueron remitidas a la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), donde se asignaron los números de acceso MF959470-MF959485. A partir de las secuencias obtenidas se generó una secuencia consenso, la cual fue alineada y comparada con las depositadas en la mencionada base de datos, mediante la herramienta BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En base a estas comparaciones se generó un árbol filogenético no enraizado, por comparación con las secuencias de mayor homología con los dos haplotipos encontrados en este estudio. Para su construcción, se

compararon los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y *neighbor joining*, utilizando el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). De esta forma se utilizó el método que presentó mayor robustez.

**Tabla 3.1.** Características de los loci microsatélites empleados para genotipificación de poblaciones de *F. hepatica*

Locus	Secuencia del primer (5'-3')	Ta
Fh_2	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTTGAGAACTGATTCACCGACTG-3' R: 5'-GAGCTTGTGCTCTCGGAACTA-3'	57 °c
Fh_5	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTCATCACCCTGTCTTCGATCA-3' R: 5'-CGAAGCATTGATAAGATTTCCTCA-3'	57 °c
Fh_6	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTACGTCCGTCCGTTAAGTGAG-3' R: 5'-TTTGAGGTCGACATCCTTCA-3'	55 °c
Fh_7	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTTGCACTCTAGCATGGTTTGG-3' R: 5'-AAGTCTTCAGTGCCCTTCC-3'	57 °c
Fh_10	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTTTTAGTCGCGGAGCTACCAT-3' R: 5'-CCACTTTCGTCATGCACATT-3'	57 °c
Fh_12	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTCCACGAGAAGTGAATTCGT-3' R: 5'-GTAGGTCCACTCCCTGTCCA-3'	60 °c
Fh_15	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTAATGCGGAAAAGAGCGATTA-3' R: 5'-GAAATTGGGAGCAACTGCAT-3'	55 °c
Fh_25	F: 5'-TAGCGTTTTGACTCTAC-3' R: 5'-GATTCGGTTAGGATGTTG-3'	51 °c
Fh_40	F: 5'-TGATAAACGACGGCCAGTTAAACCGTTGCTTCACGTTG-3' R: 5'-CAAAGTGTGGCGAGCTG-3'	57 °c

Ta: Temperatura de annealing; F: primer en sentido anterior; R: primer en sentido reverso.

### 3.3 Resultados

El análisis de los SRT reveló polimorfismo en los 9 loci. El número de promedio de alelos fue  $11 \pm 6$  por locus, con un rango de 5 a 26 dependiendo del SRT analizado (Tabla.3.2). Los alelos con mayor frecuencia de cada locus por origen se muestran en la tabla 3.3 y los de los

genotipos más frecuentes en la tabla 3.4. Todas las poblaciones de *F. hepatica* mostraron alta diversidad, alta  $H_o$  ( $0,598 \pm 0,078$ ) y  $H_e$  ( $0,722 \pm 0,047$ ) (tabla 3.5), relacionada con desviación del equilibrio de Hardy Weinberg (tabla 3.6). El valor promedio del  $F_{is}$  fue bajo ( $0,164 \pm 0.07$ ), y consecuentemente también el valor de  $S$  ( $0,28$ ). El polimorfismo observado se manifestó de forma homogénea, por lo cual no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos de acuerdo a su origen (Tabla 3.7).

El análisis del marcador COI arrojó secuencias de 423 pb, las cuales presentaron dos haplotipos definidos por una transversión (G x T), en la base 150 (base 219 del gen COI completo) (figura 3.1). De esta forma se designó como haplotipo 1(H1) al que presentó G y haplotipo 2 (H2) al que presentó T. De las 16 muestras secuenciadas, siete presentaron el haplotipo H1 y nueve el haplotipo H2.

Al comparar las secuencias obtenidas con las previamente depositadas en GenBank para el mismo locus, se observó mayor homología con aislamientos de *F. hepatica* pertenecientes a Brasil (MF696150-52), China (AJ628037/38, KX856337/38), Nigeria (FJ469984, GU112466/71), España (GU112457), Perú (KJ716822/23, KJ852772, KT869168/69), Australia (AB207103), Uruguay (AB207170), Egipto (AB553820/21/25/26), Italia (JF824271/73/84/86), Polonia (KR422383-87), Francia (AJ628039), Irán (KT893722-25), Japón (AB300704), Túnez (JK231551), Argelia (JK231549), Reino Unido (KR422348), y Estados Unidos (JU112482/83). El método de máxima parsimonia mostró mayor robustez a nivel de los

nodos de *bootstrap* que los métodos de máxima verosimilitud y *neighbor joining*, lo cual fundamentó su elección. El modelo filogenético empleado agrupó a las poblaciones del *F. hepatica* en un clado compartido con secuencias de Uruguay, Perú, Brasil, Reino Unido, Polonia, e Irán (Figura 3.2).

**Tabla 3.2** números de alelos para cada locus microsatélite analizado de *Fasciola hepática* de *Entre Ríos*.

Locus	Numero de alelos
Fh2	11
Fh5	17
Fh10	11
Fh6	26
Fh7	7
Fh12	10
Fh15	6
Fh25	5
Fh40	10

**Tabla 3.3** Frecuencias alélicas observadas por locus y origen, para marcadores microsatélites de *F. hepatica*.

Locus	Alelo	San Julián	Torcaza	Casuarinas	Castores	Total
Fh2	183	0.74	0.47	0.41	0.45	0.52
	203	0.17	0.24	0.23	0.10	0.18
Fh5	206	0.27	0.17	0.15	0.13	0.18
	209	0.21	0.24	0.19	0.17	0.20
Fh6	165	0.07	0.14	0.25	0.14	0.15
	189	0.11	0.21	0.21	0.12	0.16
Fh7	163	0.15	0.30	0.27	0.32	0.26
	181	0.42	0.23	0.27	0.34	0.31
Fh10	209	0.31	0.17	0.24	0.30	0.26
	215	0.17	0.20	0.23	0.17	0.19
Fh12	214	0.60	0.66	0.47	0.75	0.61
Fh15	233	0.68	0.45	0.62	0.77	0.64
	235	0.09	0.26	0.20	0.06	0.15
Fh25	280	0.52	0.61	0.58	0.78	0.62
Fh40	158	0.17	0.18	0.29	0.30	0.24
	160	0.52	0.43	0.31	0.59	0.46

Total: frecuencia alélica calculada para cada alelo por locus.

**Tabla 3.4** Frecuencias genotípicas más comunes por locus y origen para marcadores microsatélites de *F. hepatica*.

Locus	San Julián	Torcaza	Casuarinas	Castores
<b>Fh2</b>	183,183(0,51)	183,183(0,33)	183,183(0,22)	183,183(0,13)
	203,203(0,14)	203,203(0,1)	203,203(0,13)	203,183(0,08)
<b>Fh5</b>	203,198(0,06)	203,200(0,05)	198,159(0,05)	206,198(0,02)
	209,198(0,06)	209,203(0,05)	209,203(0,05)	209,198(0,05)
<b>Fh6</b>	253,229(0,01)	189,192(0,04)	165,165(0,03)	165,183(0,02)
	192,189(0,01)	229,253(0,01)	189,189(0,03)	189,165(0,01)
<b>Fh7</b>	181,181(0,33)	181,178(0,27)	181,178(0,54)	181,163(0,23)
	181,163(0,26)	163,175(0,46)	178,178(0,26)	181,178(0,19)
<b>Fh10</b>	215,209(0,09)	209,212(0,04)	215,209(0,09)	209,205(0,03)
	209,212(0,03)	215,212(0,04)	229,215(0,09)	209,229(0,03)
<b>Fh12</b>	214,225(0,57)	214,214(0,57)	225,214(0,30)	214,214(0,57)
	214,214(0,33)	214,217(0,09)	214,214(0,17)	225,214(0,23)
<b>Fh15</b>	233,233(0,80)	233,233(0,23)	233,233(0,80)	233,233(0,53)
	233,229(0,13)	233,235(0,09)	233,229(0,13)	233,229(0,39)
<b>Fh25</b>	280,278(0,16)	280,280(0,44)	280,280(0,44)	280,280(0,54)
	280,280(0,36)	282,280(0,36)	278,278(0,36)	278,282(0,06)
<b>Fh40</b>	160,160(0,17)	160,158(0,18)	160,156(0,06)	160,158(0,30)
	160,158(0,04)	162,143(0,12)	160,160(0,08)	160,160(0,16)

**Tabla 3.5** Índices de diversidad genética promedio para todos los aislamientos de *F. hepatica*, estimados en base al análisis de marcadores microsatélites.

Estadístico	Valor	D.E.	LIIC 95%	LSIC 95%
<b>N° de alelos</b>	11.44	2.16	8.00	15.88
<b>Ho</b>	0.59	0.07	0.45	0.74
<b>He</b>	0.71	0.04	0.62	0.80
<b>Fis</b>	0.16	0.07	0.03	0.31

Ho: heterocigosis observada; He: heterocigosis esperada; Fis: coeficiente de endogamia, D.E. desvío estándar. LIIC 95%, LSIC 95%: límite inferior y superior, respectivamente, del intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 3.6.** Índices de diversidad genética de *F. hepatica* por establecimiento de origen de los aislamientos, mediante el análisis de marcadores microsatélites.

Población	Ho	He	Fis
San Julian	0.58	0.69	0.16
Torcaza	0.62	0.75	0.17
Casuarinas	0.56	0.76	0.26
Castores	0.63	0.66	0.05

Ho: heterogenicidad observada; He: heterogenicidad esperada; Fis: coeficiente de endogamia

**Tabla 3.7.** Índice de fijación (*Fst*) entre los aislamientos de *F. hepatica*, calculado de acuerdo al establecimiento de origen marcadores microsatélites.

	San Julián	Torcaza	Casuarina	Castores
San Julian	0	0.016	0.012	0.012
Torcaza	0.016	0	-0.002	0.015
Casuarina	0.012	-0.002	0	0.017
Castores	0.012	0.016	0.018	0

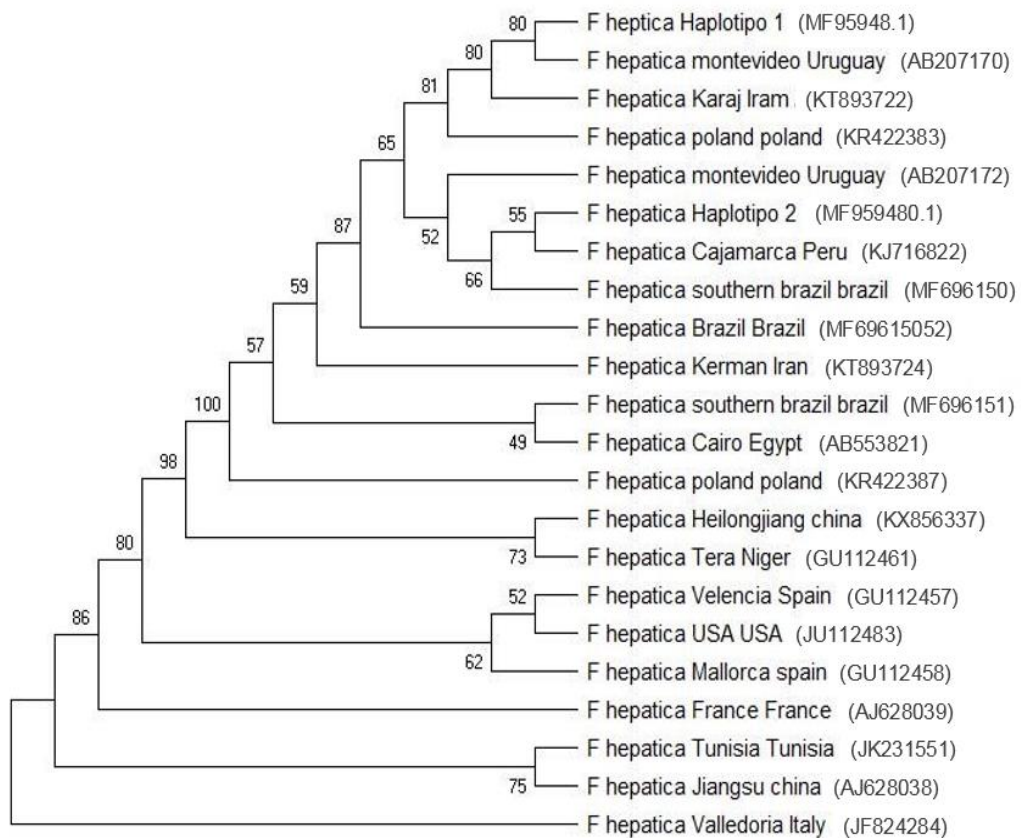
**Figura 3.1.** Secuencia correspondiente a segmento parcial del ADN mitocondrial codificante para citocromo oxidasa I, obtenida de los aislamientos de *Fasciola hepatica* del sur de Entre Ríos. Se observa en la base 150 (K) una transversión (GxT), originando dos haplotipos locales (H1 y H2).

```

1   GGGTTTTTTG GTCTTTCTTT GAGGGTGTG GTTCGTTTGA ATTATTTAGA TCCATATTTT
61  AATTTGGTTT CTCCTGAAGT TTATAATTAT GTTGTTACTG GGCATGGGAT TATAATGATT
121 TTTTTCTTTT TGATGCCGGT GTTGATTGGK GGTTTTGGTA ATTATTTGTT GCCCTTATTG
181 TTAGGGATTC CTGATTTGAA TTTGCCTCGT TTAAATGCTT TGAGTGCTTG GTTGTTATTG
241 CCTGCTTGTC TTTGTTTGTG TTTTGGTTTG ATAGGGGGTG TAGGTGTTGG TTGAACTTTT
301 TATCCGCCTC TTTCTAGGTT GGATTATTCT AGGTGGGGGG TTGATTTTTT GATGTTTTCT
361 CTTCAATTTG CTGGGGTTTC TAGTCTTTTA GGTTCTATTA AATTTATTTG TACTATTTTA
421 GAG
    
```



**Figura 3.2.** Relaciones filogenéticas entre aislamientos de *Fasciola hepatica* de establecimientos del sur de Entre Ríos, y los aislamientos de mayor homología reportados en GenBank (N=50), mediante análisis del segmento parcial COI del ADN mitocondrial. El análisis fue realizado por el método de máxima parsimonia. El porcentaje de réplicas en el cual las secuencias asociadas agruparon juntas (luego de 1000 bootstrap) se observa junto a los nodos. Los haplotipos hallados en el presente estudio corresponden a “haplotipo 1” y “haplotipo 2”.



Entre parentesis número de acceso de GenBank

### **3.4. Discusión**

El estudio de poblaciones mediante marcadores SRT en 104 adultos de *F. hepatica* extraídos de cuatro bovinos de los establecimientos del sur de Entre Ríos, mostraron diversidad en frecuencias alélicas, indicando predominancia de heterocigosis. Los alelos 183 (locus Fh2), 233 (Fh15) y 280 (Fh 25) fueron los de mayor predominancia. El tamaño de estos alelos coincide con lo descrito previamente por Hurtrez-Boussès *et al.*, (2004), y Cwiklinsky *et al.*, (2015). Aunque estos alelos no se encuentran vinculados a ningún atributo fenotípico o genotípico conocido, caracterizan a la población de *F. hepatica* en la zona de estudio. Sin embargo, debe considerarse que su representatividad es parcial, ya que solo se pudieron obtener ejemplares de *F. hepatica* de un bovino en cada establecimiento.

El coeficiente de endogamia (Fis) en las poblaciones en estudio fue bajo por consiguiente su tasa de autofecundación (S) también. Esto, sumado a la elevada variabilidad alélica y heterogeneidad, indican que la reproducción de *F. hepatica* en la región estudiada es mayormente sexual por cruzamiento, coincidiendo con lo reportado por otros autores (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2010; Elliot *et al.*, 2014; Cwiklinski *et al.*, 2015). Pese a la diversidad alélica hallada para estos marcadores, el Fst para la comparación entre poblaciones arrojó, en todos los casos, valores cercanos a cero (tabla 3.7), indicando que, en la actualidad, existe un bajo o nulo efecto de mecanismos de selección específicos, ya sea por expansión (Fst cercano a 1), u opuestamente, deficiencia o concentración de alelos (cuello de botella, Fst cercano a -1). Por consiguiente, existiría

una baja diferenciación genética entre las poblaciones (Beesley, *et al.*, 2017).

Una población es una entidad genéticamente abierta, pudiendo intercambiar información con otras poblaciones (flujo genético) como fue descrito en párrafos anteriores (Eguiarte, *et al.* 2007). En este caso, las poblaciones mostraron desvío del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indicaría que no permanecen aisladas, sino con un flujo genético constante entre ellas.

Existen actualmente pocos estudios de variabilidad genética poblacional de *F. hepatica*, por su diferentes hospedadores o zona geográfica, (Farjallah, *et al.* 2013), siendo el presente, al menos uno de los primeros estudios de estas características en nuestro país. Si bien, no se estableció diferenciación entre las poblaciones estudiadas, estas en su conjunto podrían ser comparadas con ejemplares de otras regiones, pudiendo evaluar si existe relación en ciertas características, como la resistencia a antiparasitarios. En relación a ello, en todos los establecimientos estudiados se observó resistencia a dosis estándar de albendazol y susceptibilidad a triclabendazol y closantel, mediante test de reducción del recuento de huevos (Pruzzo *et al.*, 2015).

Indicadores de endogamia por autofecundación ( $F_{si}$  y  $S$ ), podrían tener relación con fijación de alelos recesivos, y expansión poblacional de la resistencia a antihelmínticos. Contrariamente, en este estudio se observó predominio global de heterocigosis, no obstante, pueden verse algunas frecuencias genotípicas homocigotas en elevada proporción,

particularmente en el locus Fh 15 (tabla 3.4). Aunque no puede tomarse *per se* cómo indicador, la repetición de algunas frecuencias alélicas homocigotas y su relación con fenotipos resistentes sería interesante de ser explorado en forma más exhaustiva.

Al momento no se han elucidado exactamente las vías y genes que gobiernan la resistencia a los principales fasciolicidas, como albendazol y triclabendazol (Virkel *et al.*, 2009; Scarcella *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 2013; Fuchs *et al.*, 2013). Este tipo de análisis podrían ser auxiliares en este sentido, a fin de identificar características poblacionales y su relación con genotipos resistentes o susceptibles, en conjunto con otros marcadores moleculares.

La escala del presente trabajo posiblemente dificulte visualizar características poblacionales de este tipo. De esta forma el empleo de SRT sería más útil para la comparación de poblaciones geográficamente más distantes entre sí.

La presencia de los dos haplotipos hallados para COI no arrojó variación atribuible a aislamientos de cada establecimiento, pero contextualiza una tipificación local para este marcador.

Tal como sería esperable, dichos haplotipos fueron similares a otros aislamientos del cono sur de América. No obstante, también se observó similitud con otros aislamientos europeos.

En este sentido, generalmente se sostuvo que las fasciolosis fue introducida con la colonización europea en América, más precisamente en

Uruguay (Mas-Coma *et al.*, 2001; Bargues *et al.*, 2017), pero recientes hallazgos paleoparasitológicos locales en fósiles animales con más de 2000 años de antigüedad suponen que este trematodo podría haber llegado antes a América (Beltrame *et al.*, 2017). En efecto, Sey (1991), propuso que rumiantes parasitados por trematodos podría haber migrado desde Eurasia hacia América a través del canal de Bering, y posteriormente al surgimiento del estrecho de Panamá (hace 3 millones de años), haber arribado a América del Sur. Un análisis filogenético comparado con otras regiones podría mejorar el conocimiento actual en este sentido.

#### **4. Objetivo III A.**

##### **Identificación molecular de lymneidos del sur de Entre Ríos.**

###### **4.1 Introducción**

Los lymneidos actúan como hospedadores intermediarios de más de 70 especies de trematodos. Ejemplo de ello son las familias Notocotylidae y Echinostomatidae, siendo más estricta la especificidad hospedador-parásito en el caso de *F. hepatica* (Lounnas *et al.*, 2016).

Los lymneidos están ampliamente distribuidos en el mundo y, al menos 20 especies han sido descritas como potenciales hospedadores de *F. hepatica* (Correa *et al.*, 2010).

La correcta identificación de los hospedadores intermediarios contribuye, en parte, a determinar áreas de riesgo epidemiológico de fasciolosis, definir su dinámica de transmisión y profundizar en el conocimiento de la relación parasito-hospedador (Stanley *et al.*, 2014). Sin embargo, las especies son muy similares en su apariencia y establecer límites morfológicos entre ellas es difícil (Pointier *et al.*, 2006; Stanley, 2013). Especies morfológicamente similares pueden ser muy eficientes transmisores de la fasciolosis (Sanabria *et al.*, 2012), o estar presentes en regiones enzoóticas sin ser transmisoras (Bargues *et al.*, 2012).

La identificación por medio de la morfología de su conchilla se ha utilizado por varios años y aún se continúa empleando (Prepelitchi, 2009). Debido a la gran diversidad en su forma determinada por la plasticidad fenotípica, es que varias especies hoy se consideran sinónimo (Hurtrez-Bousses *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2008; Lounnas *et al.*, 2017; Alda *et al.*, 2018).

La identificación también puede realizarse utilizando el aparato reproductor (próstata, pene), pero en muchas especies da lugar a identificaciones erróneas (Pointer *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios inmunológicos, electroforesis enzimática y técnicas de biología molecular han demostrado extensiva homoplastia en las características anatómicas (Hurtrez-Boussez *et al.*, 2005; Wullschleger y Jokela, 2002).

Las diferencias entre los criterios de identificación morfológicos de la conchilla y anatómicos explican en cierta medida porque la sistemática de los lymneidos ha sido controversial (Remigio y Blair, 1997). De esta forma se han clasificado 1143 especies utilizando únicamente criterios morfológicos de su conchilla, pero actualmente se acepta que el número de especies de lymneidos podría ser menor a 100 (Pointier *et al.*, 2008).

Recientemente se han unificado criterios por la utilización de análisis filogenético de *supermatrix* (Correa *et al.* 2010), donde se utilizan tres marcadores moleculares que amplifican secuencias de ADN nuclear, como espacios de transcripción interna ribosomal 1 y 2 (ITS1 e ITS2), para la subunidad 16s ribosomal (16s) y COI y NAD1 del ADNmt. Estos genes presentan, por un lado, variabilidad suficiente para permitir discriminar especies, pero por su proximidad a regiones funcionales del genoma, también presentan estabilidad, permitiendo trazabilidad especie-específica. Por esto han sido usados en una gran cantidad de estudios filogenéticos de lymneidos (Bargues *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2010; Pujadas *et al.* 2015; Lounnas *et al.*, 2016). Además, se han utilizado marcadores SRT para caracterizar la estructura poblacional de lymneidos, lo que arroja patrones

específicos de amplificación para cada grupo y especie (Hurtrez-Bousses *et al.*, 2010; Lounnas *et al.*, 2016, Alda *et al.*, 2018) (Figura 4.2). En base a estos criterios se elaboró una PCR *multiplex*, que permite discriminar tres especies críticas (*G. cubensis*, *G. schirazensis* y *G. truncatula*) utilizando SRT. La exactitud de este método fue testada por comparación con identificaciones de especie basadas en secuencias de ADN mitocondrial y nuclear (Alda *et al.*, 2018).

Muchos de los nombres de géneros de lymneidos no se acordaron aún y se asignaron en base a similitudes fenotípicas, más que a estudios evolutivos o filogenéticos. Correa *et al.* (2010), reorganizaron a las especies en tres grandes clases de lymneidos: americanos, euroasiáticos e indopacíficos. Dentro del grupo americano hay dos subgrupos: sudamericanos y norteamericanos. En el primero se han utilizado al menos tres nombres de géneros que se consideran sinónimos: *Fossaria* (Westerlund, 1885), *Galba* (Schrank, 1803) y *Lymnaea* (Lamarck, 1799). Para unificar criterios, el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ), sugiere la utilización del nombre *Galba* como género de las especies dentro del subgrupo sudamericano (Correa *et al.*, 2010).

Incluso hoy, hay especies que se consideran co-específicas o sinónimo, tal es el caso de las recientemente descritas *G. neotropica* y *G. meridenses*, consideradas como sinónimo de *G. cubensis* y *G. cousini* respectivamente, debido a que los marcadores moleculares y su morfología no permiten diferenciarlos claramente (Pointer *et al.*, 2004; Bargues *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2011; Lounnas *et al.*, 2016, 2017; Alda *et al.*, 2018).



El objetivo de este capítulo es la identificación de los hospedadores intermediarios presentes en los establecimientos de estudio, en el sur de la provincia de Entre Ríos, a fin de verificar las especies presentes, y si esto tiene implicancias en la epidemiología local de la fasciolosis.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1. Colecta y procesamiento del hospedador intermediario**

Los muestreos de caracoles se realizaron en forma simultánea con la toma de muestra de los HD en los diferentes establecimientos durante el periodo de marzo de 2013 a septiembre de 2015.

Los muestreos se llevaron a cabo en los bordes de los arroyos, lagunas, bañados o acúmulos de agua que se encuentran próximos a los establecimientos. La búsqueda fue realizada por dos a tres personas en cada visita, por aproximadamente 3 horas. Los sitios de búsqueda fueron georreferenciados con GPS, fijándose puntos de referencia para las sucesivas búsquedas. De esta forma, se pudieron recolectar lymneidos en los establecimientos La Torcaza (departamento de Gualeguaychú), San Julián (departamento de Gualeguay), y Los Castores (departamento de Tala). Se llevó a cabo la recolección por el método de captura por remoción (Ravinovich, 1980). De acuerdo a este, se recolectan caracoles a mano por una sola persona durante 30 minutos y se colocaron en un recipiente de plástico, con agua del mismo lugar. Este tipo de muestreo permite luego la estimación de un índice de abundancia (ver capítulo siguiente). Las muestras se rotularon con nombre del establecimiento y fecha, y en esas

condiciones se trasladaron hasta el laboratorio del CEDIVE para su posterior procesamiento.

**Figura 4.1.** Toma de muestras de lymneidos en los diferentes establecimientos de las cuencas de los ríos Gualeguay y Gualeguaychú.



*A y B: arroyo no permanente y bañado en el establecimiento “La Torcaza” (departamento de Gualeguaychú). C: arroyo no permanente en el establecimiento “Los castores” (departamento de Tala). D: margen de arroyo Clé, en el establecimiento “San Julián” (departamento de Gualeguay).*

Para realizar la identificación molecular se procesaron 15 caracoles por cada origen. De cada espécimen se tomó la parte distal del pie, y se conservaron identificados por establecimiento, en etanol 96°. Para la

extracción de ADN, se realizaron 5 lavajes con agua destilada. Luego se procedió a la digestión individual de cada espécimen, como fue descripto para los ejemplares de *F. hepatica*. El material digerido se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

Para la amplificación del ADN, se utilizó una reacción de PCR *multiplex*, que incluye marcadores SRT microsatélites que permiten discriminar entre especies de lymneidos sudamericanas que son morfológicamente similares: *Galba cubensis*, *G. schirazensis* y *G. truncatula*. Cada *primer* amplifica un locus específico de una especie, como fue descripto para *G. truncatula* (Trouvé, et al. 2000), *G. cubensis* (Lounnas et al., 2016) y *G. schirazensis* (Lounnas et al., 2017) (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1** *Primers usados en multiplex PCR-detección de especies del género Galba.*

Especie y primer	Secuencia (5' – 3')	Numero de acceso GenBank	Tamaño producto PCR	Concentración Primers(µM)	Referencia
<i>Galba cubensis</i> (Lc34)	<b>F:</b> GTCACT ACTGCTTG TCTCAGC <b>R:</b> AAAAGA CTTTAACC CTTACCAC CC	AF226985	190	2	Lounnas et al. (2016)
<i>Galba schirazeinsis</i> (Ls23)	<b>F:</b> AARGAC CCAGTGG GGAAG <b>R:</b> TGGGGA AGGTTCAA TTGTTT	KT285822	235	8	Lounnas et al. (2017)
<i>Galba truncatula</i> (Lt37)	<b>F:</b> GTCCAG TCTTTGTA TGTC <b>R:</b> GTTAAG TACCCAAC TTCTTC	KT324723	120	10	Trouvé et al. (2000)

*F: primer en sentido anterior; R: primer en sentido reverso.*

El ADN extraído de cada individuo fue amplificado en un volumen final de 10µl conteniendo: 3 µl de agua ultrapura, 5 µl de Taq PCR *mastermix* Kit (Quiagen), 1 µl de *primer mix*, a las concentraciones especificadas en la tabla 4.1, y 1 µl de ADN en un vial de 0,2 ml. La reacción de PCR se llevó a cabo mediante una desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 52°C por 90 segundos y extensión a 52°C por 1 minuto, seguida por una extensión final a 60°C por 30 min. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis durante 2 horas a 100v en gel de agarosa al 5% teñido con EZ Vision (VWR Chemicals, USA).

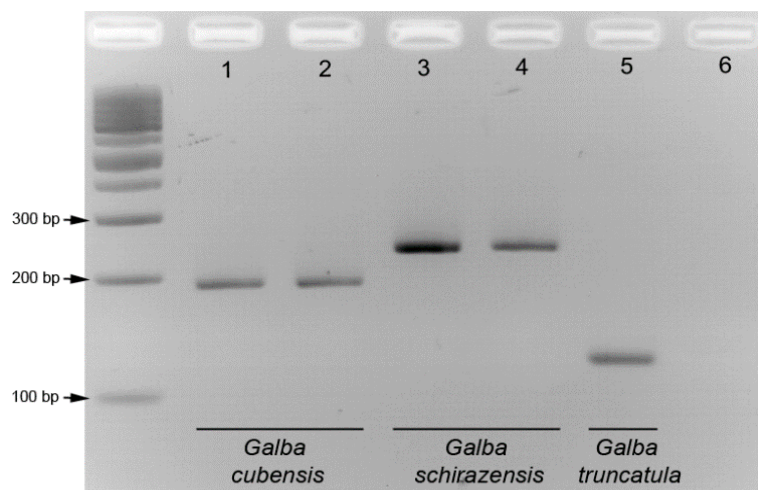
En paralelo al método anterior, sobre las mismas muestras de ADN extraído, se amplificó el segmento ITS 2 en cinco ejemplares de cada origen, utilizando los primers descritos por Almeida-Artigas *et al.* (2000): ITS2 F: 5' TGTGTCGATGAAGAACGCAG 3', e ITS2 R: 5' TTCTATGCTTAAATTCAGGGG 3'. La amplificación fue desarrollada en un volumen final de 50 µl, conteniendo 35,5 µl de agua ultrapura, 5 µl de Buffer, 2 µl de cloruro de magnesio, 0,5 µl de taq polimerasa (Invitrogen, USA), 0,5 µl de cada uno de los primers, y 5 µl de ADN. Se utilizó como control ADN previamente extraído y amplificado de *G. cubensis*. La reacción de PCR incluyó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, *annealing* a 50°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 3 minutos. Los productos de la amplificación fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con el agregado de SYBRSafe

(Invitrogen, USA), y purificados posteriormente con el kit Quick-g DNA Miniprep (Zymo Research, USA), y enviadas para su secuenciación a la Unidad Genómica del Instituto de Biotecnología - INTA Castelar. Las secuencias obtenidas fueron procesadas y alineadas utilizando los programas *Chromas 2.1.8* (*Technelysium Pty Ltd, Australia*) y *Clustal Omega* (EMBL-EBI, Reino Unido), y luego sometidas a comparación con secuencias reportadas en GenBank para el grupo *Lymnaea/Galba/Fossaria*. Una vez alineadas y corroboradas, las secuencias fueron reportadas a GenBank.

#### 4.3 Resultados

Los marcadores SRT indicaron compatibilidad de las 45 muestras analizadas con patrones correspondientes a *G. cubensis* (Figura 4.2).

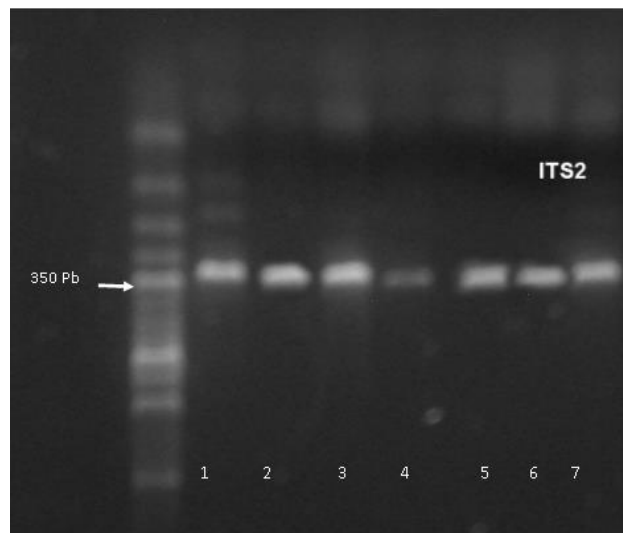
**Fig. 4.2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos del multiplex PCR de diferentes especies del género *Galba*.



Se obtuvieron 15 amplificación del segmento ITS 2, 5 por cada origen, las cuales arrojaron amplicones de aproximadamente 400 pb (figura 4.3). Las

secuencias obtenidas fueron idénticas entre sí. Tras la edición y alineado de las secuencias, se obtuvo una secuencia representativa de de 365 pb (figura 4.4). Esta secuencia presentó un 100% de identidad con el segmento ITS2 reportado para un aislamiento de *G. cubensis* de Argentina (KT781173) y *G. cubensis* de Venezuela (KT781218) (Alda *et al.*, 2015). También se observó 100 % de identidad con secuencias de *G. neotropica* (AM412225) (Bargues *et al.*, 2007). Las secuencias obtenidas fueron reportadas en GenBank bajo los números de acceso KP897135-44 y KP897150-54.

**Figura 4.3.** Electroforesis en gel agarosa de las amplificaciones de los segmentos ITS2 de lymneidos del sur de Entre Ríos.



Calles 1 y 2: establecimiento San Julián (departamento Gualeguay). Calles 3 y 4: establecimiento Los castores (departamento Tala). Calles 5, 6 y 7: establecimiento La Torcaza (departamento Gualeguaychú).

**Figura 4.4.** Secuencia consenso (365 pb), correspondiente al segmento parcial 5.8S, segmento completo ITS2 y segmento parcial 28S de ADN ribosómico de los aislamientos de *Galba cubensis* (*Syn. G. neotropica*) del sur de Entre Ríos.

```
1   GGTTCGGCTAG TCACAAAGCA ATCGTGTCTT TTGCAGCTCT CGCAAAAAAC CAAAGCCTTG
61  CTGCTCGCA  CGCTCGGCGA TGGTTGGATA CGCCCTGGAC CCTCGCGGCC TAACTGAAGC
121 TGTCGTTGCC TTGCTCGGCT TCGACGGTGT AGGTGACGGC CCCGTGGTCT TAAGCGCAAG
181 CCGCGCCGTT GTCCGTTTCAT CTCGTAACGT CTTCGACGCT GCCCTGCTCT TGGCGGCCTG
241 TCCGTTTTTC TCTACCGCCA GGCAGGACCC GGCTCGCTTA CTGGCGTTC TCGGGCCTGC
301 AGTCCTTGGC ATCTCAGCTC GTGGGTGGAG AGCAACGGGC TTCACGTCGA GGAATATTAC
361 TTGAT
```

#### 4.4 Discusión

En base la técnica multiplex PCR la única especie identificada en la zona de estudio fue *G. cubensis*. De la misma forma, para el segmento ITS2 observo 100% de identidad con *G. cubensis* (KT781173, KT781218) reportadas en GenBank, no encontrándose diferencias entre los establecimientos estudiados, ni mutaciones que sugieran divergencia de especies o subespecies.

En el segmento ITS2 no solo se observó homología con reportes previos de *G. cubensis*, sino que también se observó 100 % de identidad con secuencias de *G. neotropica* (AM412225). Esto pone de manifiesto lo mencionado anteriormente respecto a similitudes interespecíficas, y a la simplificación del clado en un menor número de géneros y especies.

La relativa cercanía entre los establecimientos, la gran capacidad de dispersión de esta especie, y su capacidad autofecundante podrían explicar la falta de variación (Meunier *et al.*, 2004; Bargues *et al.*, 2011; Lounnas *et al.*, 2016; Alda *et al.*, 2018). Estas características hacen posible que unos

pocos individuos, pueden colonizar nuevos lugares formando grandes poblaciones en relativamente corto tiempo (Bargues, *et al.* 2011).

Si bien *G. cubensis* presenta una amplia distribución en toda América (Correa *et al.*, 2010; Burgarella *et al.*, 2015), el presente estudio no descarta que coexistan otras especies no halladas durante los muestreos, en menor proporción (Bargues *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2014). En este sentido, debe tenerse en cuenta que en tres de los establecimientos no se pudo hallar caracoles en los dos años de evaluación.

Existen informes de identificación de la coexistencia de *G. cubensis* y *G. viator* (Stanley *et al.*, 2013), lo cual podría producir cambios proporcionales de una u otra especie, incluso de forma cíclica, de acuerdo a las condiciones ambientales, y modificando de alguna forma la infestación del HD. Sin embargo, poco se sabe sobre la capacidad de especies de *Galba* para mantenerse en equilibrio, e incluso reemplazar otras especies del mismo género en el tiempo (Alda *et al.*, 2018).



## **5. Objetivo III B**

### **Abundancia y estructura poblacional de lymneidos**

#### **5.1. Introducción**

Se ha observado que, en regiones de clima templado-cálido, algunos lymneidos presentan una dinámica poblacional anual y cíclica, con mayor abundancia y predominio de caracoles de tamaño grande en los meses más fríos y secos, y con descenso de la abundancia en los meses más calurosos y lluviosos (Kleiman, 2004). Por otro lado, en otros trabajos no se ha encontrado un patrón estacional en la abundancia y estructura poblacional (Cañete *et al.* 2004; Coelho y Lima, 2008).

La presencia, la abundancia y la estructura poblacional de los lymneidos están sujetas a las fluctuaciones ambientales (Gerard, 2001). Entre estas interrelaciones, la temperatura y las precipitaciones son las variables que más influyen sobre la densidad y variabilidad poblacional (Ollerenshaw, 1971; Torgerson y Claxton, 1999). Se ha informado que la temperatura influye directamente en la biología de los organismos poiquiloterms, afectando la tasa de reproducción, y la edad de maduración sexual, entre otros procesos biológicos. La humedad también juega un rol importante en la presencia de los HI, ya que estos requieren de suelos saturados de agua (Venturini, 1990).

Cuando las condiciones ambientales son idóneas y prolongadas en el tiempo, estas especies mantienen una alta tasa de crecimiento y reproducción, pero cuando están sujetas a ciclos favorables y

desfavorables, se observa una dinámica de tipo “*crash - boom*”, con crecimiento y reproducción abundantes cuando las condiciones son favorables y una disminución abrupta cuando dejan de serlo (Prepelitchi, 2009). La rápida recuperación de la población de lymneidos se debe a que son especies hermafroditas, pudiendo reproducirse por autofecundación o fecundación cruzada (Dillon, 2000). Se ha visto incluso que los especímenes criados aisladamente producen más huevos que criados de a pares (Gutiérrez *et al.*, 2000).

La supervivencia de los caracoles luego de su estivación dependerá de la resistencia que presenten a las condiciones ambientales adversas (tiempo durante el cual fueron sometidos) y de su tamaño (Thaddeus y Bernard, 1999).

Los lymneidos suelen estar enterrándose en el barro o retraídos en su conchilla, permaneciendo sobre la vegetación, barro, troncos, etc. Se ha observado que los lymneidos de mayor tamaño son más resistentes a las condiciones adversas que los más pequeños.

El tamaño aproximado en el cual los lymneidos comienzan a poner huevos es de 4 mm, presentando una alta tasa de reproducción (Kleiman *et al.*, 2007). Un solo espécimen puede llegar a poner 2.300 huevos durante su vida reproductiva, que es de aproximadamente 98 días (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Por lo expuesto, resulta fundamental determinar cómo se comporta la población de los lymneidos para comprender la epidemiología de la fasciolosis (Beesley *et al.*, 2017).

Por ello, el objetivo de este capítulo fue determinar la abundancia y estructura poblacional de los lymneidos en aquellos establecimientos donde se hallaron especímenes en la mayoría de los muestreos realizados.

## **5.2 Materiales y métodos**

Se trabajó con dos de los tres establecimientos en donde se encontraron caracoles en los diferentes muestreos realizados: “San Julián” y “La Torcaza”, el primero correspondiente a la cuenca de río Gualeguay y el segundo al río Gualeguaychú. No se trabajó con los lymneidos capturados en “Las Casuarinas” debido a la escasez de ejemplares hallados en forma esporádica. Durante el periodo de estudio se colectaron un total de 865 lymneidos. Para poder determinar un índice de abundancia poblacional (AHÍ), se utilizó el método de captura por unidad de esfuerzo (Prepelitchi, 2009), definiéndose como el número de ejemplares capturados durante 30 minutos por una sola persona. Los caracoles recolectados por esta metodología fueron colocados en envases de plásticos junto con agua y barro del sitio de colecta, se rotularon con los datos fecha y establecimiento, y fueron trasladados al laboratorio.

Para estudiar la estructura y dinámica poblacional se realizó la medición de todos los ejemplares recolectados, mediante análisis digital de imágenes (Raffo *et al.*, 2010). Para ello, se colocaron los caracoles sobre un film

transparente respetando una separación mínima entre ellos, junto con una porción de papel milimetrado para la posterior calibración espacial. Luego este montaje fue llevado a un escáner (Epson® Stylus TX235W).

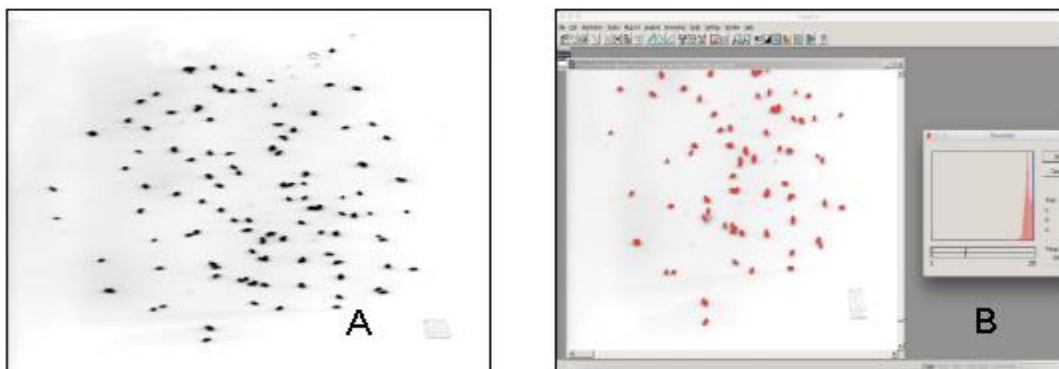
Se configuro la imagen de salida en tamaño de hoja A4, escala de grises 8 bit de 300 pixeles por pulgadas, formato .jpg, y se obtuvo una imagen de valores de pixeles entre 0 (negro) y 255 (blanco). Para realizar el análisis de la imagen se utilizó el programa UTHSCSA Image Tool 3.02 (Bio-soft Net), el cual permite discriminar la morfología y tamaño en base a los pixeles que ocupa el objeto. Una vez cargadas las imágenes escaneadas, se calibro la dimensión espacial de la imagen, mediante selección de la distancia sobre el papel milimetrado, y se incorporó la referencia en milímetros.

Se individualizaron los objetos seleccionando la zona más oscura (silueta de los caracoles) y se estableció el punto de corte en el rango de valores de pixeles entre 0 y 90 (Figura 5.1). Luego, el programa entrega una tabla con las medidas de dichos atributos, los cuales fueron exportados a una hoja de cálculo. De acuerdo a Kleiman *et al.* (2007), los lymneidos mayores a 4mm se consideraron maduros sexualmente.

Se realizó la comparación del índice de abundancia (cantidad de caracoles capturados por la misma persona en 30 min) entre los diferentes meses de muestreo, independientemente del año, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 95%, utilizando la prueba de Dunn como post hoc.

Para analizar la relación entre la abundancia poblacional, y el tamaño de los caracoles y las variables climáticas ( $T^\circ$ , máxima, mínima, media, precipitaciones, exceso y déficit hídrico), se realizó correlación no paramétrica de Spearman entre el primer parámetro y los demás, con un nivel de significancia del 95%. Las variables climáticas incluidas en el modelo de correlación fueron temperatura media  $T^\circ M$ , máxima ( $T^\circ \text{máx}$ ), mínima ( $T^\circ \text{min}$ ) y precipitación mensual ( $Pm$ ). Dichos parámetros fueron registrados durante el mes de muestreo ( $M0$ ), dos ( $M-2$ ), y cuatro ( $M-4$ ) meses antes de cada visita a los campos.

**Fig. 5.1.** *Análisis digital de imágenes para estimar la longitud de caracoles mediante el software Image Tool 3.02*



*A) imagen blanco y negro obtenida por el escáner. B) Individualización manual de objetos de la imagen por nivel de pixel.*

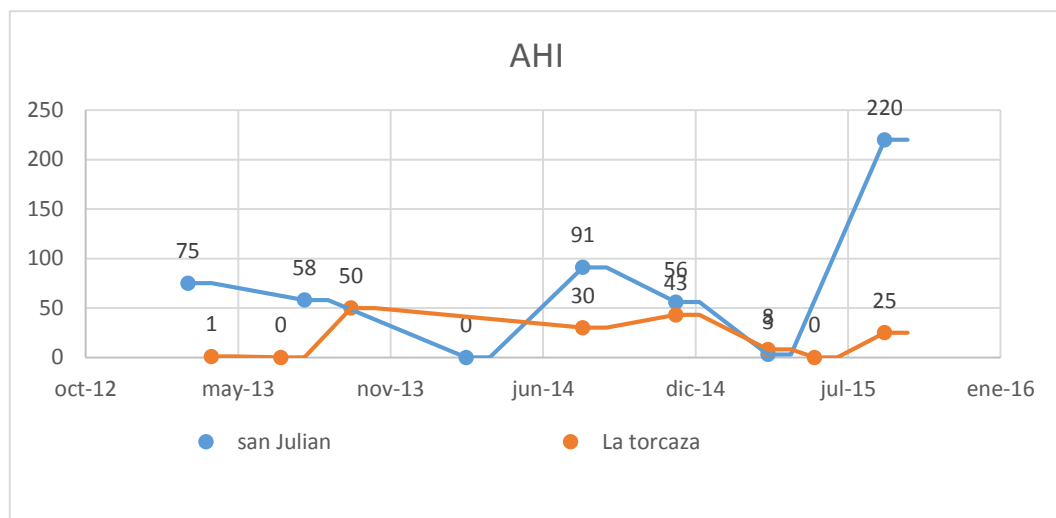
### **5.3. Resultados**

Abundancia poblacional

En la figura 5. 2. se observa la abundancia de lymneidos en los diferentes meses en los que fueron capturados.

En este sentido, se hallaron diferencias significativas entre los diferentes muestreos, observándose mayor abundancia en los muestreos de finales de invierno y principio de primavera (agosto, septiembre y octubre), y menos en los muestreos de fines de verano (marzo, abril y mayo) ( $p < 0,001$ ).

**Fig 5.2** Abundancia de hospedadores intermediarios (AHI) por mes y año de los establecimientos San Julián (Gualeguay) y La Torcaza (Gualeguaychú).



Esta densidad poblacional, se correlacionó negativamente con la temperatura media y máxima de los dos meses anteriores al muestreo ( $R = -0,35$ ,  $p < 0,001$  y  $R = -0,23$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente). No se encontraron asociación entre el AHI y el resto de las variables climáticas analizadas, ni con los HPG y prevalencia en los bovinos.

### Estructura poblacional

Los ejemplares de *G. cubensis* capturados midieron en promedio 4,48 mm (Rango: 0,57-8,67mm). Se encontraron diferencias significativas en los tamaños de los mismos entre los diferentes muestreos y entre los diferentes

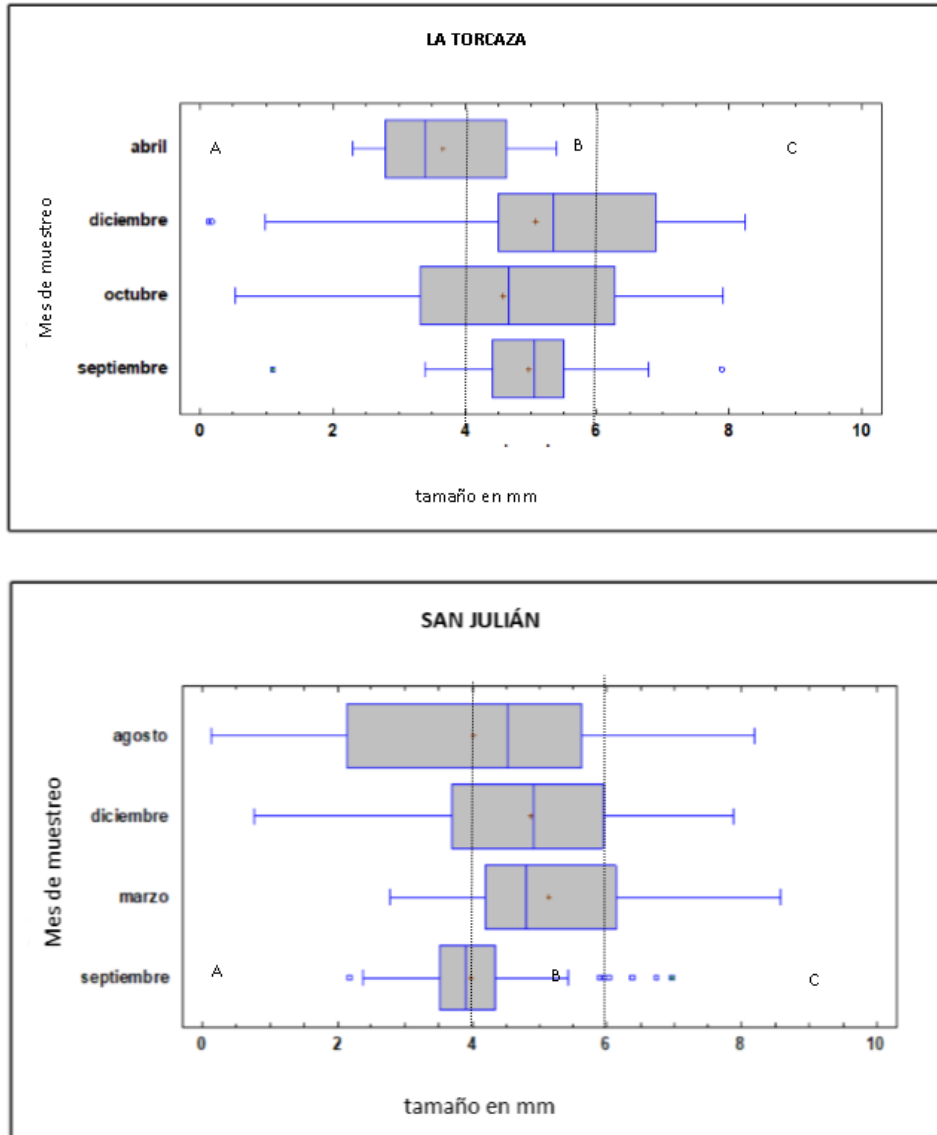
meses ( $p < 0,001$ ), siendo en los meses de verano (diciembre a marzo) donde mayor proporción de lymneidos grandes (mayores a 6 mm) se hallaron (Promedio: 6,88; DS 0,65) (figura 5.3), y en los meses de fines de invierno, principios de primavera donde mayor proporción de caracoles pequeños ( $< 4\text{mm}$ ) (promedio: 2,63; DS: 1,25) y medianos (entre 4 y 6mm) se encontraron.

#### **5.4 Discusión**

En el establecimiento San Julián, perteneciente a la cuenca del río Gualeguay y al departamento del mismo nombre, los lymneidos fueron hallados en los márgenes del arroyo Clé. Estos se encontraron en pequeños depósitos de agua, o en zonas de barro húmedo, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, ya que *G. cubensis* es anfibia y habita preferentemente en este tipo de ambientes (Prepelitchi, 2009). De los muestreos realizados, solo en uno (marzo de 2014) no se capturaron lymneidos, debido a una crecida y desborde del arroyo. Aunque esto constituye en parte un medio hostil para la mayoría de las especies de lymneidos (Gerard 2001), es también un vehículo hacia los potreros inundados, y una vía de dispersión, lo cual puede dificultar su hallazgo. La dispersión de los caracoles permite la colonización y formación de poblaciones temporarias y focos secundarios en zonas aledañas (Olaechea, *et al.* 2001).

Los lymneidos del área del establecimiento La Torcaza, perteneciente a la cuenca del río Gualeguaychú y al departamento homónimo, se encontraron

Figura 5.3. Distribución del tamaño de *Galba cubensis* durante el estudio.



Las líneas punteadas verticales representan las distintas categorías de tamaños: A: chicos (<4mm); B: medianos (>4 y <6mm) C: grandes(>6mm); \* = promedio, Línea vertical.

en un bañado. Durante el primer semestre de 2014 no se pudieron realizar muestreos debido a que la crecida del río Uruguay inundó dicha zona, imposibilitando el acceso al campo. En los dos establecimientos, los meses



de mayor abundancia fueron los meses de agosto, septiembre y octubre, donde los registros de temperatura media fueron entre 14,5 a 15,5°C. También se observó la mayor cantidad de caracoles pequeños y medianos, indicando una alta tasa de reproducción. En los meses de diciembre a marzo- abril se observó la disminución de esta cohorte y el aumento de los de tamaño grande, siendo estos últimos, los más resistentes a los ambientes adversos (Torgenson y Claxton, 1999). En este trabajo, los coeficientes de correlación entre la AHI y la T° media y máxima de dos meses anteriores al muestreo determinaron una asociación discreta, a pesar de ello, no debería desestimarse el rol de la temperatura en la dinámica poblacional, ya que otros autores han observado asociaciones negativas en este sentido (Prepelitchi, 2009). Otros en cambio destacaron la importancia de la temperatura en el crecimiento y desarrollo del HI (Aguiar, 2010; Olaechea et al., 2007; Venturini, 1990). Prepelitchi (2009), mencionó que el patrón de abundancia de *P. columella* estaría relacionado con la presencia y la abundancia de otros caracoles que integran la comunidad de gasterópodos, como los de los géneros *Ampullaria*, *Physa*, *Drepanotrema* y *Biomphalaria*, potenciales competidores por sustrato y recursos. Esta variable no puede ser extrapolada directamente a *G. cubensis*, ya que, por su naturaleza anfibia, no prefieren el mismo ambiente que los mencionados géneros (Rumi et al., 2003).

Si bien no se halló una relación estadísticamente significativa entre la abundancia y estructura poblacional de los caracoles con la prevalencia en los bovinos, en los periodos de mayor abundancia poblacional la oferta

permanente de huevos de *F. hepatica* en el ambiente podría producir incrementos en la tasa de infestación del HI, aportando mayor disponibilidad de MTC al ambiente.

## **6. Objetivo V**

### **Evaluación de la susceptibilidad de los lymneidos a la infestación por *Fasciola hepatica*.**

#### **6.1. Introducción**

La presencia de *F. hepatica* en una región depende fundamentalmente de la presencia de su hospedador intermediario que, como fue mencionado para la zona de estudio, sería *G. cubensis*. En ellos se produce una multiplicación asexual del parásito, donde un solo miracidio puede llegar a producir más de 1000 MTC (Sanabria *et al.*, 2012). Los parásitos son capaces de un rápido cambio evolutivo en relación a sus hospedadores, debido a su corto ciclo de vida, al corto tiempo entre generaciones y a su alta fecundidad, dando como resultado una rápida adaptación al genotipo del hospedador local, como también a las condiciones ambientales (Holmes, 1983).

Se ha observado que la producción de cercarias es diferente según la especie de lymneidos (Sanabria *et al.*, 2012), y que la capacidad de infección de *F. hepatica* en su hospedador intermediario difiere según su origen geográfico. Experimentalmente, se observaron variaciones en la producción de MTC en relación a la especie del hospedador intermediario (Vignoles *et al.*, 2015). Además, se ha estudiado la capacidad infectante en términos de producción de MTC, en base a infestaciones de HI con aislamientos alopátricos y simpátricos. En este sentido, las combinaciones alopátricas parecen tener mejor tasa de infectividad en lymneidos (Gasnier

*et al.*, 2000; Sanabria *et al.*, 2013). Para ello, diferentes factores bióticos y abióticos influyen en el desarrollo de *F. hepatica* dentro del HI, y por consiguiente en el número de generaciones de redias producidas y en la emisión de cercarias (Rondelaud *et al.*, 2013; Vignoles *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta lo enunciado, el objetivo de este capítulo fue determinar la susceptibilidad diferencial de las especies o poblaciones de lymneidos estudiados pertenecientes a distintos establecimientos, frente al desafío experimental con aislamientos de *F. hepatica* del mismo origen.

## **6.2 Materiales y métodos**

Se trabajó con caracoles obtenidos de los establecimientos San Julián (Gualeduay), La Torcaza (Gualeduaychú), y Los Castores (Tala). Los lymneidos capturados fueron analizados para determinar la presencia de estadios larvarios de *F. hepatica*. Para ello, los caracoles capturados fueron observados a trasluz bajo lupa estereoscópica (30X) (Figura 6.1). Al 50% de los ejemplares se le realizó el método de aplastamiento (Prepelitchi, 2009), que consiste en romper la conchilla con un objeto romo, y observar posteriormente con lupa estereoscópica, la presencia de formas larvarias, permitiendo así mayor precisión.

Los caracoles que no fueron sacrificados para la identificación de formas larvarias fueron criados separadamente según su origen para luego ser sometidos experimentalmente a infecciones con miracidios de *F. hepatica* del mismo origen.

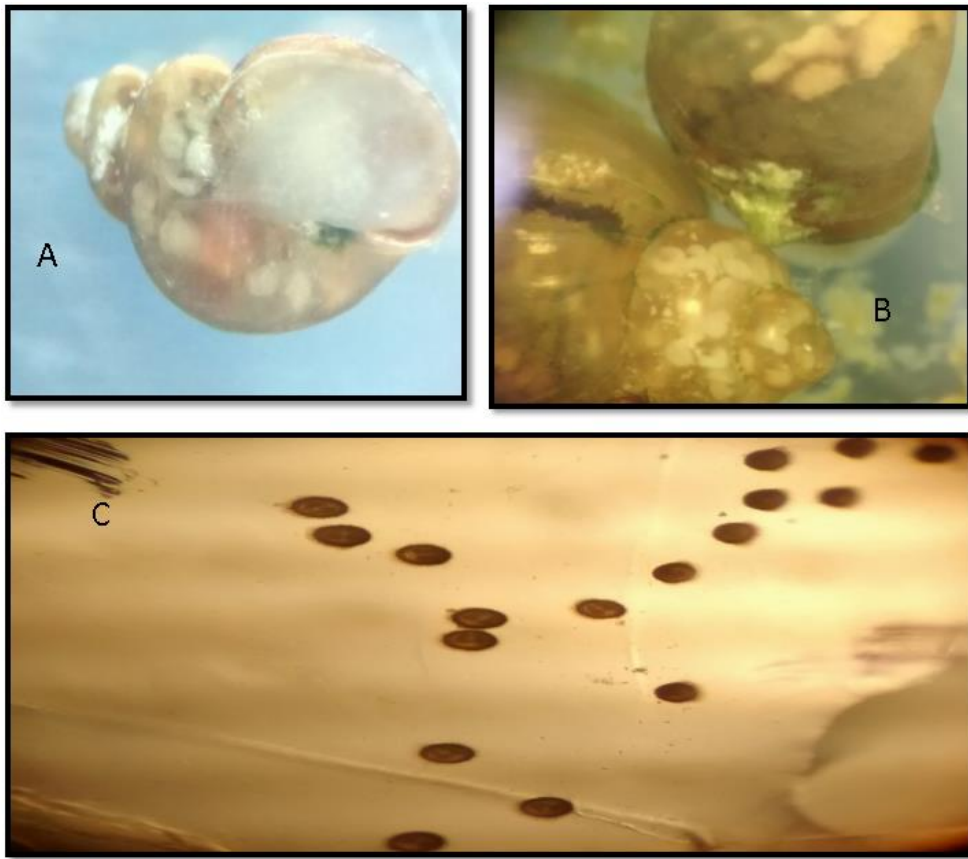
Para ello, se formaron grupos de 10 ejemplares en recipientes de 500ml. Allí se mantuvieron 3 a 4 días con agua del lugar donde fueron capturados, así como también, con barro y vegetación del lugar de origen. Se alimentaron con hojas de lechuga seca (Rondelaud *et al.* 2013), y suplemento de *Arthrospira* spp. (Espirulina) deshidratada, dos veces por semana (Prepelitchi *et al.*, 2014) (figura 6.2). El agua se reemplazó dos veces por semana para mantener la oxigenación (Rondelaud *et al.*, 2007).

Se obtuvieron huevos de *F. hepatica* de vesícula biliar, en necropsias de cuatro animales de los establecimientos estudiados. Luego de su obtención, los huevos fueron lavados con solución fisiológica 0,9% varias veces e incubados por 20 días a 25°C en oscuridad.

Cien lymneidos de cada establecimiento, mayores a 4mm fueron expuestos individualmente a 2 miracidios de un aislamiento de *F. hepatica* del mismo origen. Para ello fueron alojados en placas de 24 pocillos junto a los miracidios recién eclosionados, donde permanecieron 4 h (Figura 6.3), para luego ser trasladados a los recipientes de cría. Entre los 20 y 30 días post infestación los caracoles que sobrevivieron se examinaron una vez por semana bajo lupa estereoscópica con el fin de determinar si presentaban formas larvianas de *F. hepatica* (Figura 6.1). Los caracoles positivos a la presencia de redias o cercarias fueron colocados individualmente en placas de Petri de 35mm y alimentados con Espirulina, con recambios diarios de alimento y agua. Con igual frecuencia se realizó conteo y remoción de MTC en cada placa de Petri, aplicándose este proceso hasta la muerte de caracol.

Para evaluar la susceptibilidad a la infestación, se tuvo en cuenta el número de caracoles sobrevivientes al día 30 post infestación, el período prepatente y la producción de MTC. Los resultados, se compararon mediante prueba de Kruskall Wallis, con un nivel de significación del 95%.

**Figura 6.1.** *Infestación de Fasciola hepatica en Galba cubensis.*

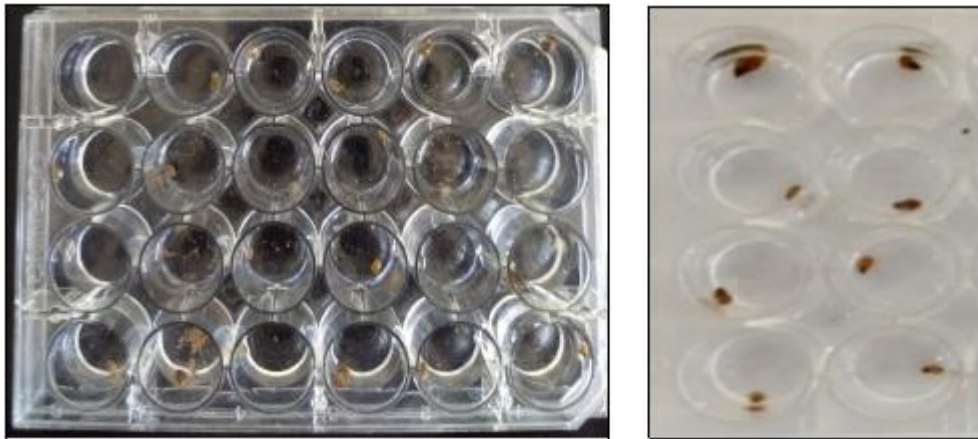


*A y B: estadios larvarios observados a trasluz por lupa estereoscópica, en el interior de G. cubensis 30X. C: metacercarias observadas en placa de Petri a los 42 días post-infestación, 35X.*

Fig.6.2 Cría de lymneidos en laboratorio.



Fig 6.3 Placa de 24 pocillos donde son colocados los caracoles de manera individual para la infestación con *F. hepatica*.



### 6.3. Resultados

No se observaron infestaciones naturales por *F. hepatica* en los caracoles observados a trasluz, ni en aquellos que fueron aplastados.

En la tabla 6.1 se muestran los resúmenes de los resultados de la producción de MTC, periodo de prepatencia, y numero de caracoles sobrevivientes al día 30 post infestación.

La supervivencia de los lymneidos a los 30 días no mostro diferencias significativas de acuerdo al origen ( $p=0,42$ ). Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de MTC producidas y su origen ( $p=0,88$ ), ni entre este y el periodo de prepatencia ( $p=0,90$ ).

**Tabla 6.1.** *Parámetros obtenidos de la infestación experimental por Fasciola hepatica de Galba cubensis, de acuerdo al establecimiento de origen.*

Origen	Torcaza	Los Castores	San Julián
N° de caracoles expuestos.	100	100	100
Sobrevivientes al día 30.	65	67	78
Caracoles infectados.	60	52	53
Periodo Prepatente promedio (DS) en días.	48,5 (6,4)	48,8 (10,0)	46,8 (8,2)
Promedio de metacercarias producidas (DS) por caracol.	186,4 (90,2)	168,0 (95,5)	166,1 (56,5)

## 6.4 Discusión

La ausencia de diferenciación en la producción de MTC podría estar explicada por la adaptación que presenta *F. hepatica* a la especie de HI local, así como también a las condiciones ambientales locales (Gasnier *et al.*, 2000).



Se han reportado diferencias en la producción de MTC en lymneidos según el origen geográfico de los aislamientos de *F. hepatica* (Rondelaud *et al.*, 2013). Aunque las poblaciones estudiadas pertenecen a diferentes localidades, la distancia que las separan podría no ser suficientemente amplia como para producir cambios adaptativos locales (Rondelaud *et al.*, 2013). Esto además concordaría con que la única especie identificada en el sur de la provincia de Entre Ríos es *G. cubensis*. La falta de diferencias entre aislamientos pone de manifiesto una adaptación local parásito-HI. Con esto en mente, la infestación de caracoles con aislamientos alopátricos de *F. hepatica* podría mejorar la sensibilidad, en función de encontrar poblaciones más o menos sensibles al desafío experimental.

## **7. Conclusiones**

Los hallazgos del presente estudio ponen de manifiesto que la fasciolosis ocurre de forma endémica en el sur de la provincia de Entre Ríos, estando presente, al menos, en cada evento de muestreo realizado. Se hallaron tasas de prevalencia moderadas a elevadas en el hospedador definitivo, y no se hallaron infestaciones naturales en el hospedador intermediario. Otros estudios epidemiológicos indicaron que no existe una relación directa entre la prevalencia en el ganado y en los lymneidos (Amato *et al.*, 1986), ya que las MTC no son necesariamente ingeridas inmediatamente después de formarse, y pueden permanecer infectivas durante varios meses en el ambiente. De esta forma el ganado puede infectarse, incluso aunque el caracol no esté presente (Roberts y Sahordono, 1996).

La prevalencia en los bovinos fue siempre superior al 40% en los diferentes muestreos. Estos niveles, en general, no reflejan una infestación inmediata en bovinos, sino que la longevidad de estos trematodes y un daño crónico, y relativamente de bajo impacto clínico en esta especie, permite la acumulación de cargas en el tiempo. Solo el efecto de la desparasitación tendería a reducir las cargas parasitarias, pero teniendo en cuenta que se halló una gran dispersión de la resistencia a albendazol, muchos de los tratamientos implementados reducirían escasa o nulamente las poblaciones de *Fasciola*. Bajo este escenario regional de resistencia a albendazol, solo triclabendazol, salicilanilidas (closantel, nitroxinyl) y eventualmente bencenosulfonamidas (clorsulon, no evaluado en el presente estudio), podrían ser útiles para el control de la fasciolosis en esta

región. El empleo de bencimidazoles metilcarbamatos debería estar sujeto a una previa evaluación de eficacia en cada establecimiento.

Del punto de vista epidemiológico, existió una asociación significativa entre suelos de pobre drenaje y la prevalencia de *F. hepatica*, lo cual permitió delimitar regiones donde se puede mantener la infestación por aptitud para el desarrollo del HI (figura 2.10). Además, se observó mayor probabilidad de hallazgo de animales positivos (OR=2,86) en los periodos de mayor temperatura, por lo cual en los meses de septiembre a marzo sería el momento para implementar estrategias de manejo y control farmacológico que reduzcan la incidencia. Respecto a la prevalencia, ésta se relacionó significativamente con la temperatura máxima de dos meses antes de la fecha de muestreos. Esto indicaría posiblemente una relación entre la duración del período prepatente y el momento de infestación, sugiriendo que, incluso antes del inicio del período de mayor riesgo (septiembre) sería conveniente la implementación de estrategias de tratamiento y manejo.

Los análisis filogenéticos y moleculares de *F. hepatica* evidenciaron diversidad genética, lo cual estaría relacionado a procesos de recombinación vinculados principalmente a fecundación cruzada entre individuos. No se encontraron diferencias genéticas en *F. hepatica* entre las poblaciones estudiadas, indicando cruzamiento aleatorio y alto flujo genético entre estas. En este estudio se observó resistencia generalizada a ABZ, fenómeno que se asoció, en estudios previos, a la predominancia homocigota en nematodes (Diawara *et al.*, 2013). No obstante, no está claro aún el mecanismo por el cual se produce resistencia a este fármaco

en *F. hepatica*. En nematodos, predominan mutaciones puntuales en el sitio activo, que consisten en el caso de ABZ, en la sustitución de tirosina por fenilalanina en el codón 200 del isotipo 1 de  $\beta$ -tubulina, (Kwa *et al.*, 1994), aunque otras mutaciones fueron demostradas con posterioridad (Sylvestre y Cabaret, 2002; Ghisi *et al.*, 2007). Sin embargo, Chambers *et al.* (2010), hallaron una mayor afinidad de ABZ por el isotipo 2 de  $\beta$ -tubulina en *F. hepatica*, y aun no está claro el protagonismo de mecanismos inespecíficos en la resistencia a ABZ, como la sobre-expresión de la detoxificación mediada por citocromo P450 o glicoproteína-P (Kotze *et al.*, 2014). Esta incertidumbre hace difícil suponer si la resistencia local a ABZ se presenta por fijación de genes (lo cual parece menos probable para este estudio), o bien mediante posibles mecanismos inespecíficos, en respuesta a, por ejemplo, subdosificaciones (dosis nematodocida de ABZ de 5 mg/kg vs. fasciolocida de 10 mg/kg), e incluso combinaciones de varios mecanismos. Estudios de mayor profundidad son necesarios en este aspecto.

Respecto al HI, no se hallaron caracoles infectados naturalmente por *F. hepatica*. Algunos trabajos mencionaron prevalencias de hasta 88,4% (Malone *et al.*, 1984), pero en nuestro país se registraron infecciones del 2,1% en *P. collumela* en Corrientes (Prepelitchi, 2009), similar a lo encontrado en *G. truncatula* en la provincia de Mendoza (Rubel *et al.*, 2005).

Los estudios moleculares evidenciaron la presencia de una sola especie, identificada como *G. cubensis* de acuerdo a la nomenclatura vigente, que sería, al menos, la especie predominante en la región. Su adaptación al

medio, el equilibrio HI-parásito y la posibilidad de desplazamiento por las crecientes y reducciones frecuentes en los cursos de agua locales podrían contribuir a vehicular linajes de *F. hepatica* ABZ-resistentes. Esto podría explicar, al menos parcialmente, la amplia dispersión del fenómeno de resistencia a esta droga.

Los análisis de estructura poblacional revelaron una mayor abundancia entre fines de invierno y principios de primavera, pero un mayor tamaño promedio durante el verano y principios de otoño. Esto indica una expansión poblacional primaveral favorecida por las condiciones ambientales de temperaturas moderadas y humedad, que luego tiende a reducirse en número en favor de los ejemplares sobrevivientes que adquieren mayor tamaño. Estos mismos ejemplares, por sus características, tienen mayor posibilidad de resultar infectados, originando el pie de infección ambiental de otoño y la reserva biológica para la siguiente expansión poblacional primaveral.

A nivel experimental, *G. cubensis* mostro eficiencia como hospedador de *F. hepatica*, ya que 83 % de los caracoles sobrevivientes al día 30 resultaron infectados. No obstante, la producción de MTC fue casi diez veces menor que infestaciones reportadas para esta especie con aislamientos europeos de *F. hepatica* (Sanabria *et al.*, 2013). Esto, sumado a la relativamente baja mortalidad luego de la infestación, podría manifestar una adaptación o “equilibrio” parásito-hospedador a nivel local.

Aunque solo en algunos establecimientos pudieron hallarse lymneidos, no pudo establecerse diferencias de susceptibilidad a *F. hepatica* entre

diferentes aislamientos, ni indicadores moleculares relacionados a esta característica, lo cual indica nuevamente cierta homogeneidad poblacional local.

Finalmente, las observaciones realizadas en estos trabajos contribuyen a explicar la dinámica de infestación de la fasciolosis en el sur de Entre Ríos, donde la predominancia de infestación en los bovinos ocurre a fines de invierno y principios de primavera, asociada a ambientes con suelos de bajo drenaje. Bajo estas condiciones, es necesario implementar medidas de control estacional que contribuyan a reducir la incidencia regional de esta parasitosis. Es importante además la evaluación de los fármacos a nivel predial a fin de evitar fallas en los tratamientos.

## 8. Bibliografía

Andrews SJ. 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Fasciolosis, J. P. Dalton (Ed). London, UK, CABI International, 544.

Aguilar M. 2010. Situación de *Fasciola hepatica* al sur del paralelo 48°. Tesis de Magister Scientiae. Facultad de Cs. Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, 78.

Alda P, Lounnas M, Vázquez AA, Ayaqui R, Calvopiña M, Celi-Erao M, Dillon RT, Jarne P, Loker ES, Muñiz Pareja FC, Muzzio-Aroca J, Nárvaez AO, Noya O, Robles LM, Rodríguez-Hidalgo R, Uribe N, David P, Pointier JP, Hurtrez-Boussès S. 2018. A new multiplex PCR assay to distinguish among three cryptic *Galba* species, intermediate hosts of *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. 251:101-105.

Amato SDB, Deepened HEB, Gomez DC, Freire NM. 1986. Da Serra. Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraíba River Valley, Sao Paulo, Brazil. Vet Parasitol, 22 (3-4).275-284.

Amer S, Dar Y, Ichikawa M, Fukuda Y, Tada C, Itagui T, Nakai. 2011. Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (ND1 and COI) gene markers. Parasitol Int, 60(1):5–12.

Aguirre D, Cafrune M, Salatín A, Abeyá A. 2005. Fasciolosis clínica en cabras de Metán (Salta, Argentina). Revista FAVE – Ciencias Veterinarias 4 (1-2).

Aykanat T, Johnston SE, Cotter D, Cross TF, Poole R, Prodóhl PA, Reed T, Roga G, Mc Ginnity P. 2014. Primmer CR. Molecular pedigree reconstruction and estimation of evolutionary parameters in a wild Atlantic salmon river system with incomplete sampling: a power analysis. *BMC Evol Biol.* 14(1):68.

Bargues M, Mas-Coma S. 1997. Phylogenetic analysis of Lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol.* 14(5):569-577.

Bargues M, Artigas P, Mera y Sierra R, Pointier JP, Mas-Coma S. 2007. 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(7): 621-641.

Bargues MD, Artigas P, Khoubbane M, Mas-Coma S. 2011. DNA sequence characterization and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *L. meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasit Vectors.* 4:132.

Bargues M, Gayo V, Sanchis J, Artigas P, Khoubbane M, et al. 2017. DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(2): e0005352.



Beesley NJ, Williams DJL, Paterson S, Hodgkinson, J. 2017. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. *Int J Parasitol.* 47(1):11-20.

Beltrame M, Tietze E, Pérez A, Bellusci A, Sardella, N. 2017. Ancient parasites from endemic deer from "CUEVA PARQUE DIANA" archeological site, Patagonia, Argentina. *Parasitol Res.* 116:1523-1531.

Boray J C. 1964. Studies on the ecology of *Lymnaea tomentosa* the intermediate host of *Fasciola hepatica*. History, geographical distribution and environment. *Australian J Zool.* 12:217-230.

Boyce W, Courtney C, Loggins P. 1987. Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *Int J Parasitol.* 17:1233-1237.

Burgarella C, Gayral P, Ballenghien M, Bernard A, David P, Jarne P, Correa A, Hurtrez-Bousses S, Escobar J, Galtier N, Glemin S. 2015. Molecular evolution of freshwater snails with contrasting mating systems. *Mol Biol Evol.* 32(9):2403-2416.

Cabrero J, Camacho J. Fundamentos de genética de poblaciones. En: Soler Cruz M. Evolución: la base de la biología. España. Proyecto Sur; 2002. p. 83-126.

Cañete R, Yong M, Sánchez J, Wong L, Gutiérrez A. 2004. Population dynamics of intermediate snails hosts of *Fasciola hepatica* and some

environmental factors in San Juan y Martinez municipality, Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98(3):257-262.

Cosenza M, Reale S, Lupo T, Vitale F, Caracappa S. 2015. Allele frequencies of microsatellite loci for genetic characterization of a Sicilian bovine population. Genet Mol Res. 14(1):691-9.

Cardozo H, Paiva N, Acosta D, Armentano J. 1991. Importancia de *Fasciola hepatica* sobre la ganancia de peso y su porcentaje de preñez al segundo entore en ganado de carne infestado naturalmente. Veterinaria. 27(111):4-10.

Carvalho O, Cardoso P, Lira P, Rumi A, Roche A, Berne E, Müller G, Caldeira R. 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 Inst Oswaldo Cruz. 99(5):503-507.

Chambers E, Ryan LA, Hoey EM, Trudgett A, McFerran NV, Fairweather I, Timson DJ. 2010. Liver fluke  $\beta$ -tubulin isotype 2 binds albendazole and is thus a probable target of this drug. Parasitol Res. 107(5):1257-64.

Charlier J, Caroliene B, Caron Y, Counotte M, Ducheyne E, Guy H, Vercruysse J. 2011. Towards assessing fine-scale indicators for the spatial transmission risk of *Fasciola hepatica* in cattle. Geospat Health 5(2):239-245.

Ghisi M, Kaminsky R, Maser P. 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveal a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 144(3-4):313-320.

Coelho LHL, Guimarães MP, Lima WS. 2008. Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*. *J Helminthol*. 82:77-80.

Coles GC, Stafford KA. 2001. Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet Rec*. 148(23):723-724.

Correa AC, Escobar JS, Durand P, Renaud F, David P, Jarne P. 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the *Lymnaeidae* (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evol Biol*. 10:381.

Correa AC, Escobar JS, Noya O, Velásquez LE, González-Ramírez C, Hurtrez-Boussès S, Pointier JP. 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropic *Lymnaeidae* (Gastropoda: Lymnaeidae), vectors of fasciolosis. *Infect Genet Evol*. 11(8):1978-1988.

Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Genchi CA. 2006. Dual anthelmintic treatment strategic scheme for the control of fasciolosis in dairy sheep farms. *Parasitol Res*. 99(6):700-705.

Cruz R. 2014. Sistemas de información geográfica nivel 1. Centro de Capacitación de Ciencias Geográficas. Disponible en: [www.ing.gob.ar](http://www.ing.gob.ar).

Cwiklinski K, Allen K, LaCourse J, Williams D, Paterson S, Hodgkinson J. 2015. Characterization of a novel panel of polymorphic microsatellite loci for the liver fluke, *Fasciola hepatica*, using a next generation sequencing approach. *Infect Genet Evol.* 32:298-304.

Dar Y, Amer S, Courtioux B, Dreyfuss G. 2011. Microsatellite analysis of *Fasciola* spp. in Egypt. *Parasitol Res.* 109(6):1741-1744.

Dar Y, Lounnas M, Djuikwo Teukeng FF, Mouzet R, Courtioux B, Hurtrez-Bousses S, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. 2013. Variations in local adaptation of allopatric *Fasciola hepatica* to French *Galba truncatula* in relation to parasite origin. *Parasitol Res.* 112(7):2543-2549.

Diawara A, Schwenkenbecher JM, Kaplan RM, Prichard RK. 2013. Molecular and biological diagnostic tests for monitoring benzimidazole resistance in human soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg.* 88(6):1052-1061.

Dillon RT. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. 2012. Local adaptation of the trematode *Fasciola hepatica* to the snail *Galba truncatula*. *Parasite.* 19:71-275.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. 2016. Current decline in the number and size of *Galba truncatula* and *Omphiscola glabra* populations, intermediate hosts of *Fasciola hepatica*, on the acidic soils of Central France. *Parasite.* 23:46.

Dutra LH, Molento MB, Naumann CRC, Biondo AW, Fortes FS, Savio D, Malone JB, 2010. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using geographic information systems. *Vet Parasitol.* 169:76-81.

Elliott T, Muller A, Brockwell Y, Murphy N, Grillo E, Toet MH, Anderson G, Sangster E, Spithill T. 2012. Evidence for high genetic diversity of NAD1 and COX1 mitochondrial haplotypes among triclabendazole resistant and susceptible populations and field isolates of *Fasciola hepatica* (liver fluke) in Australia. *Vet Parasitol.* 200:90-96.

Engler P, Rodríguez M, Cancio R, Handloser M, Vera ML. 2008. Zonas AgroEconómicas Homogéneas de Entre Ríos. Descripción ambiental, socioeconómica y productiva. Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales. INTA ISSN N°6 1851-6955.

Estoup A, Martin O. Marqueurs microsatellites: isolement à l'aide de sondes non-radioactives, caractérisation et mise au point .1996. Disponible en: <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>.

Hope-Cawdery MJ, Strickland KL, Conway A, Crowe PJ. 1977. Production effects of liver fluke in cattle I. The effects of infection on liveweight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. *British Veterinary Journal.* 133(2):145-159.

Fairweather I, Lawrence T, Threadgold y Robert, EB Hanna. 1999. Development of *Fasciola hepatica* in mammalian host. J P Dalton (Ed). London. CABI International, p 47-111.

Fairweather I, Boray J. 1999. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J.* 158(2):81-112.

Flynn RJ, Mulcahy G, Welsh M, Cassidy JP, Corbett D, Milligan C, Andersen P, Strain S, McNair J. 2009. Co-Infection of Cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis* - Immunological Consequences. *Transbound Emerg Dis.* 56(6-7):269-297.

Fox NJ, White PCL, Mc Clean CJ, Marion G, Evans A, Hutchings MR. 2011. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One.* 6(1):e16126.

Gasnier N, Delaud D, Abrous M, Carreras F, Boulard FC, Diez-Baños P, Cabaret J. 2000. Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology* 30(5):573-578.

Gayo V, Mera-Sierra R. 2010. Latin America controls liver fluke (*Fasciola hepatica*) in livestock and humans. Disponible en: [www.naweb.iaea.org/nafa/aph/stories/2010-fasciola-project.html](http://www.naweb.iaea.org/nafa/aph/stories/2010-fasciola-project.html).

Gérard C. 2001. Consequences of a drought on freshwater gastropods and trematode communities. *Hydrobiologia.* 459(1-3):9-18.

Głazewska I, Gralak B, Naczka AM, Prusak B. 2018. Genetic diversity and population structure of Polish Arabian horses assessed through breeding and microsatellite data. *Anim Sci J.* 89(5):735-742.

Gonzalez-Lanza, Manga-Gonzalez P, Del Pozo-Carnero P, Hidalgo-Argüello R. 1989. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Vet Parasitol.* 34(1-2):35-43.

Gutiérrez A, Yong M, Wong L, Sanchez J. 2002. The effect of isolation on reproduction and growth of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae): a snail conditioned water experiment. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 97(6):869-870.

Hanna, REB, Moffett D, Forster FI, Trudgett AG, Brennan GP, Fairweather I. 2016. *Fasciola hepatica*: a light and electron microscope study of the ovary and of the development of oocytes within eggs in the uterus provides an insight in to reproductive strategy. *Vet Parasitol* 221:93-103.

Hartl D, Clark A. Principles of Population Genetics. Harris RE y Charleston WAG, ed. Fourth ed. Massachusetts: Oxford University Press; 2007.

Harris RE, Charleston WAG. 1977. The response of the freshwater gasteropods *Lymnaea tomentosa* and *L. columella* to desiccation. *J Zool.* 183:41-46.

Harris RE, Charleston WAG. 1977 An examination of the marsh microhabitats of *Lymnaea tomentosa* and *L. columella* (Mollusca: Gastropoda) by path analysis. *N Z J Zool.* 4:395-399.

Hebert PD, Ratnasingham S, DeWaardm JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 270(Suppl 1):S96-S99.

Holmes JC. 1983. Evolutionary relationships between parasitic helminths and their hosts in Futuyma DJ, Slatkin M, editors. Coevolution. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc. Inc. p,161-85.

Hurtrez-Boussès S, Meunier C, Durand Patrick, Renaud François. 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*) Microbes and Infection. 3:841-849.

Hurtrez-Boussès S, Durand P, Jabbour-Zahab R, Guégan J, Meunier C, Bargues M, Mas-Coma S, Renaud F. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). Molecular Ecology Notes. 4:689-690.

Hurtrez-Boussès S, Pendin A, Bernabé C, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez-Boussès JE, Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. Canad J Zool. 83(12):1643-1648.

Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Terasaki T, Shibahara T, Fukuda K. 2005. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitology. 135(Pt 5):679-685.

Khademi N, et al. 2016. Identifying HIV distribution pattern based on clustering test using GIS software, Kermanshah, Iran. HIV & AIDS Review. 215(4):147-152.



Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. 2016. Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. Trends Parasitol. 32(6):458–469.

Kleiman F, Pietrokovsky S, Paraense LW, Wisnivesky-Colli C. 2004. Southernmost finding of *Lymnaea viatrix* Orbigny, 1835 (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in urban and rural areas of Patagonia, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(1):23-24.

Kleiman F, Pietrokovsky S, Prepelitchi L, Carbajo A, Wisnivesky-Colli, C. 2007. Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. Vet Parasitol. 145:274-286.

Kotze A, Hunt P, Skuce P, von Samson-Himmelstjerna G, Martin R, Sager H, Krücken J, Hodgkinson J, Lespine A, Jex A, Gilleard J, Beech R, Wolstenholme A, Demeler J, Robertson A, Charvet C, Neveu C, Kaminsky R, Rufener L, Alberich M, Menez C, Prichard R. 2014. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 4(3):164-184.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 35(6):1547-1549.

Kwa MSG, Veenstra JG, Roos MH. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol.* 63(2):299–303.

Lounnas M, Vázquez AA, Alda P, Sartori K, Pointier JP, David P, Hurtrez-Boussès S. 2017. Isolation, characterization and population-genetic analysis of microsatellite loci in the freshwater snail *Galba cubensis* (Lymnaeidae). *J Mollus Stud.* 83:63-68.

Lounnas M, Correa AC, Alda P, et al. 2018. Population structure and genetic diversity in the invasive freshwater snail *Galba schirazensis* (Lymnaeidae). *Can J Zool.* 96:425-435.

Malone JB, Craig T. Cattle Liver Flukes: Risk Assessment and Control. En: D Bechtol, J Pollreisz, editors. *Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian.* Texas; 1999. p.754.

Malone JB. Enfermedades del sistema hepatobiliar. En: Bradford P. Smith, editor. *Medicina Interna de Grandes Animales.* Cuarta edición. España: Elsevier; 2010. p. 905-910.

Martins IVF, Avelar BR, Pereira MJS, Fonseca AH. 2012. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo State, Brazil. *Geospat Health.* 6(3): S87-S93.

Marcos LA, Terashima A, Leguia G, Canales M, Espinoza JR, Gotuzzo E. 2007. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Rev gastroenterol Perú.* 27(4):389-396.

Mas-Coma S, Funatsu I, Bargues M. 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*. 123 Suppl: S115-27.

Meirmans PG, Van Tienderen PH. 2004. Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*. 4:792-794.

Mera y Sierra R, Artigas P, Cuervo P, Deis E, Sidoti L, Mas-Coma S, Bargues M. 2009. Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Vet Parasitol*. 166(1-2):73-79.

Mera y Sierra R, Agramunt VH, Cuervo P, Mas-Coma S. 2011. Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasit Vectors*. 4:104.

Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Bargues MD, Mas-Coma S, Pointier JP, Jourdane J, Renaud F. 2011. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol Ecol* 10(5):1333-1340.

Meunier C, Hurtrez-Boussès S, Jabbour-Zahab R, Durand P, Rondelaud D, Renaud, F. 2004. Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusk *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity*. 92(4):316–322.

Mooney L, Good B, Hanrahan JP, Mulcahy G, de Waal T. 2009. The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural

acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Vet Parasitol.* 164(2-4):201-205.

Nicot A, Dubois MP, Debain C, David P, Jarne P. 2008. Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Molecular Ecology Resources.* 8:1281-1284.

Odening K, Samnaliev T. 1987. A New amphistome cercaria from *Lymnaea truncatula* in Europe. *Ann Parasitol Hum Comp.* 62(2):117-121.

Olaechea F. *Fasciola hepatica*. En: Víctor H Suarez, Fermín Olaechea, Jorge Romero, ed. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes del cono sur de América. Argentina: INTA; 2007. p.159-168.

Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol.* 178(3-4):364-366.

Olaechea F, Gayo V, Cardozo H, Acosta D. Epidemiología y Control de *Fasciola hepatica*. En: C Feil y A Nari, ed. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Argentina: Editorial Hemisferio Sur; 2013. p.301-320.

Ollerenshaw CB. 1971. The influence of climate on the life cycle of *Fasciola hepatica* in Britain with some observation on the relationship between climate and the incidence of fasciolosis in the Netherlands. En: Facts and reflections, Symposium Proceedings (3 June 1971), Parasitology Department of the central Diergeneeskunding Institut, Lelystad, pp.41-63.

Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, Lamenza P, Solana H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol.* 195(1-2):118-121.

Overend DJ, Bowen FL. 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 72:275-276.

Pleasance J, Wiedosari E, Raadsma H, Meeusen E, Piedrafita D. 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol* 33(9):495-505.

Pointier JP, Cazzaniga, N, Gonzalez-Salas C, Guti Interrez A, Arenas J, Bargues M, Mas-Coma S. 2006. Anatomical studies of sibling species within neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(4):431-435.

Pointier JP, David P, Koene J. Basommatophora gastropods. En: Cordoba, Aguilar y Leonard, ed. *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals.* New York: Oxford University Press; 2010. p.173-196.

Prepelitchi L, Kleiman F, Pietrokovsky SM, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez J, Wisnivesky-Colli C. 2009. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(7):889-91.

Prepelitchi, L. 2009. Eco epidemiología de *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) en el norte de la provincia de Corrientes destacando aspectos

ecológicos de *Lymnaea columella* (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como hospedador intermediario. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires; 2009.

Prepelitchi I, Pujadas J, Wisnivesky-Colli C. 2015. The effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) (Oscillatoriales: Cyanobacteria) on the experimental breeding of *Pseudosuccinea columella* (Basommatophora: Lymnaeidae). *Rev Biol Trop.* 63(2):479-489.

Pruzzo C, Sanabria R, Medus D, Reyna G, Romero J. *Fasciola hepatica*: spread of albendazole resistance in Central Eastern Argentina. En: XXV Conferencia de la World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology. Liverpool; 2015.

Raffo F, Larroza M, Olaechea F. Propuesta y evaluación de una metodología de análisis digital de imagen para estimar la longitud de los caracoles *Lymnaea viatrix*. En: XVIII Reunión Científico-Técnica de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico. Corrientes; 2010.

Recalde-Reyes D, Padilla Sanabria L, Giraldo Giraldo MI, Toro Segovia LJ, González MM, Castaño Osorio JC. 2012-2013. Prevalencia de *Fasciola hepatica*, en humanos y bovinos en el departamento del Quindío-Colombia. *Infectio.* 18(4):153-157.

Remegio E, Blair D. 1997. Molecular systematics of the freshwater snail (Pulmonata: Basommatophora) utilizing mitochondrial ribosomal DNA sequences. *J Moll Stud.* 63:173-185.

Rodríguez-Morales A, Orrego-Acevedo C, Zambrano-Muñoz Y, García-Folleco FJ, Herrera-Geraldo AC, Lozada-Riascos C. Mapping malaria in municipalities of the Coffee Triangle region of Colombia using Geographic Information Systems (GIS) *J Infect Public Health*. 8:603-611.

Rojas Moncada J, Palomino Lozano G, Calderón Silva T, Terán Saucedo J. 2013. Diagnóstico de resistencia antihelmíntica de *Fasciola hepatica* a los antiparasitarios de uso más común en bovinos de cuatro Distritos de Cajamarca, Perú. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/diagnostico-resistencia-antihelmintica-fasciola-t30162.htm>.

Rojo Vazquez FA, Ferre Perez. Parasitosis hepática. En: Cordero del Capillo M, Rojo Vazquez FA, coord. Parasitología Veterinaria. Primera edición. España: McGraw Hill-Interamericana; 1999. 260-282.

Rondelaud D, Titi A, Vignoles P, Mekroud A, Dreyfuss G. 2014. Adaptation of *Lymnaea fuscus* and *Radix balthica* to *Fasciola hepatica* through the experimental infection of several successive snail generations. *Parasit Vectors*. 7:296.

Rondelaud D, Fousi M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G. 2007. Optimization of metacercaria production for three digenean species by the use of Petri dishes for raising lettuce-fed *Galba truncatula*. *Parasitol Res*. 100:861-865.

Rousset, F, 2008. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP 802 software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour*. 8, 103–106. 803

Rose H, Rinaldi L, Bosco A, Mavrot F, de Waal T, Skuce P, Charlier J, Torgerson PR, Hertzberg H, Hendrickx G, Vercruysse J, Morgan ER. 2015. Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet Rec.* 176(21):546.

Ross JG. 1970. The Stormont “wet-day” forecasting system for fascioliasis. *Br Vet J.* 126:401-408.

Rubel D, Prepelitchi L, Kliman F, Carnevale S, Wisnivesky-Colli C. 2005. Estudio del foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquén. *Medicina* 65:207-212.

Sanabria R, Ceballos L, Moreno L, Romero J, Lanusse C, Alvarez L. 2013. Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. *Vet Parasitol.* 193(1-3):105-10.

Sanabria R, Mouzet R, Courtioux B, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J, Romero J. 2012. Intermediate snail hosts of French *Fasciola hepatica*: *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix* are better hosts than local *Galba truncatula*. *Parasitol Res.* 111(5):2011-2016.

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

Shaw N, McGuire S. 2017. Understanding the use of geographical information systems (GIS) in health informatics research: A review. *J Innov Health Inform.* 24(2):940.



Silvestre A, Cabaret J. 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol Biochem Parasitol.* 120(2):297-300.

Spithill TW, Dalton JP. 1998. Progress in development of liver fluke vaccines, *Parasitol Today.* 14(6):224-227.

Stanley CJ, Goodacre S, Wade C, Stothard JR. 2014. The population genetic structure of *Biomphalaria choanomphala* in Lake Victoria, East Africa: implications for schistosomiasis transmission. *Parasit Vectors.* 7:524.

Thaddeus K, Graczy K, Bernard F. Development of *Fasciola hepatica* in intermediate host. En: JP Dalton, ed. London; 1999. p.31-43.

Thrusfield, M. (1990) *Epidemiología Veterinaria*. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 339p

Torgerson P, Claxton J. Epidemiology and control. En: JP Dalton, ed. London; 1999. p.544.

Toth G, Gaspari Z, Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10(7):967-981.

Trouvé S, Degen L, Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Guégan JF, Goudet J, Renaud F. 2009. Microsatellites in the hermaphroditic snail, *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Mol Ecol.*9(10):1662-1664.

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 Arg.* 7(62): 84-90.

Vercruysse J, Holdsworth P, Letonja T, Barth D, Conder G, Hamamoto K, Okano K. 2001. International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines. *Vet Parasitol.* 96(3):171-193.

Vidigal T, Spatz L, Kissinger J, Redondo R, Pires E, Simpson A, Carvalho O. 2004. Analysis of the First and Second Internal Transcribed Spacer Sequences of the Ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* Complex (Mollusca: Planorbidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99:153-158.

Vignoles P, Novobilský A, Höglund J, Kašný Ma, Pankrác J, Dreyfuss G, Pointier J, Rondelaud D. 2014. *Lymnaea cubensis*, an experimental intermediate host for *Fascioloides magna*. *Fol Parasitol* 61(2):185-188.

Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. 2015. *Fasciola hepatica*: comparative metacercaria productions in experimentally-infected *Galba truncatula* and *Pseudosuccinea columella*. *Parasite.* 22:15.

Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G. 2016. Aptitude of *Lymnaea palustris* and *L. stagnalis* to *Fasciola hepatica* larval development through the infection of several successive generations of 4-mm-high snails. *Parasitol Res.* 115(6):2263-8.

Vilas R, Vazquez-Prieto S, Paniagua E. 2012. Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep:

implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infect Genet Evol.* 12(1):45-52.

Wulschleger EB, Jokela J. 2002. Morphological plasticity and divergence in life history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *J Moll Stud.* 68(1):1-5.