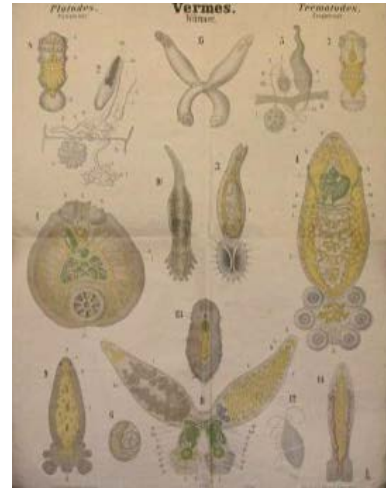
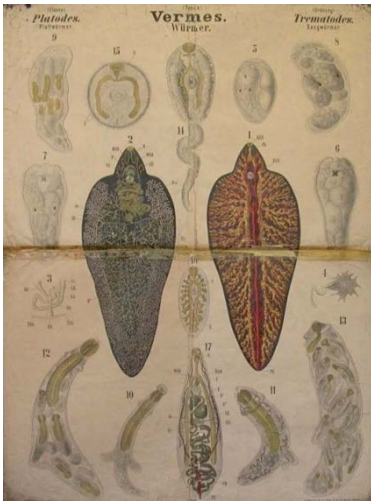


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULDADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“EPIDEMIOLOGÍA DE LAS
TREMATODOSIS BOVINAS EN LA
REGIÓN DE SALTO (URUGUAY)”**



Jaime Manuel Sanchís Polto

Lugo, diciembre de 2014



Los Profesores Doctores del Departamento de Patoloxía Animal (Área de Sanidade Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo) de la Universidade de Santiago de Compostela, Doña María Sol Arias Vázquez, Doña Rita Sánchez-Andrade Fernández y D. Adolfo Paz Silva,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Epidemiología de las trematodosis bovinas en la región de Salto (Uruguay)”**, que presenta el Licenciado en Veterinaria D. JAIME MANUEL SANCHÍS POLTO para optar al Título de Doctor con Mención Europea, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 18 de diciembre de 2014.

María Sol Arias Vázquez

Rita Sánchez-Andrade Fernández

Adolfo Paz Silva

"Conocer algo, es haber logrado las respuestas al qué, cuándo, cómo, y por qué de ese algo".

- *Sócrates*

“Usted aprende
y usa lo aprendido
para volverse lentamente sabio
para saber que al fin el mundo es esto
en su mejor momento una nostalgia
en su peor momento un desamparo
y siempre siempre
un lío”.

- *Mario Benedetti*

Santiago de Compostela, 22 de setembro de 2010


En el marco del programa Erasmus Mundus External Cooperation Window (EMECW), con código de proxecto: 2009-1796/001-001-ECW, el Consorcio EMUNDUS17 selecciona a:

Jaime Manuel Sanchis Polto

Nacido el 17.02.1964, con pasaporte número AA0563262 expedido el 07.09.2009 válido hasta el 07.09.2014 para cursar íntegramente el Programa de Doutoramento en Investigación en medicina e sanidade veterinarias en la *Universidade de Santiago de Compostela* con matrícula gratuita.

El Jefe de la Oficina de Relaciones Exteriores




Enrique López Veloso
Jefe de la Oficina de Relaciones Exteriores
Universidade de Santiago de Compostela



Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária

DECLARACIÓN

Para los debidos y legales efectos, D. LUÍS MANUEL MADEIRA DE CARVALHO, Médico Veterinário, Profesor Asociado con Habilitación de Parasitología y Enfermedades Parasitarias en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Lisboa, Portugal, supervisor de estancia de D. JAIME SANCHIS, Médico Veterinario, Profesor de Parasitología de la Facultad de Veterinaria del Uruguay, con Master en Patología y Sanidad Veterinaria por la Universidad de Santiago de Compostela, realizando trabajos de investigación en *Fasciola hepatica*, *Paramphistomum* spp. y otras trematodosis para su tesis de Doctorado Europeo, declara que desarrolló una estancia de investigación en su laboratorio desde el 1 de Octubre al 31 de Diciembre de 2012 (3 meses).

Más informa que D. JAIME SANCHIS recibió instrucción y adiestramiento y procedió al desenvolvimiento de técnicas de diagnóstico de trematodosis parasitarias en ganado vacuno y equino en su laboratorio, relacionadas con su Tesis Doctoral.

Todo lo cual firma, para que surta los efectos oportunos, en Lisboa, a 10 de Marzo de 2014.

LUIS MANUEL MADEIRA DE CARVALHO
(Profesor Asociado con Habilitación)



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y entidades que han participado en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

AL Programa Emundus17 (Beca Erasmus Mundus External Cooperation Window) y al Banco Santander por su apoyo económico y a la Universidad de Santiago de Compostela que me acogió para realizar la Tesis Doctoral.

A mis directores, que son mucho más que eso, Profesores Doctores: Rita Sánchez-Andrade Fernández, Adolfo Paz-Silva y María Sol Arias Vázquez, por haberme propuesto un tema de Tesis tan real y acorde con mis preferencias, haberme guiado y hacerme sentir en familia en otro país. A los tres, muchas gracias por su inestimable ayuda, ánimo, paciencia, comprensión y amistad. Les debo mucho.

A los Catedráticos del Departamento de Patología Animal, Prof. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo y Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por el apoyo brindado en esta investigación.

A la Dra. María Isabel Macchi y al Dr. Gustavo Maldini, invalorable colegas, sin cuya colaboración, en muchos sentidos, me hubiese resultado imposible llevar a cabo esta tarea.

A la Dra María Angélica Solari, baluarte de mi trabajo y colaboradora directa en este proyecto, y a la Dra Valeria Gayo, con ella he compartido dudas y aprendido mucho sobre las trematodosis del vacuno.

Al Profesor Dr. Luis Madeira de Carvalho, Catedrático de la Universidad de Lisboa, por su ayuda, amistad, y disposición a este proyecto. Extiendo mi agradecimiento a todos los colegas universitarios portugueses que de una forma u otra colaboraron en este trabajo.

Al Dr. José Luis Suárez, (Pepe) por su amistad, consejos y disposición de acompañarnos en todo momento.

A los Dres. Pablo Piñeiro, Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez, Ángel Romasanta Blanco y Pablo Díaz Fernández, por su amistad.

A las doctorandas Cristiana Cazapal, Silvia Miguélez e Isabel Rodríguez (la otra familia española), compañeras de faena y de café, de ellas he recibido muchísima ayuda y con ellas he pasado momentos muy agradables durante la realización de esta Tesis.

A la nueva generación de doctorandos: Rodrigo Bonilla, Fabián Arroyo, Andreu Oliver y José Ángel Hernández Malagón porque sus anhelos y expectativas me ayudaron a no desanimarme en el final.

A mi familia, por comprenderme (tarea muy difícil) y apoyarme en este emprendimiento.

En especial, me gustaría dedicar esta memoria a mi madre, por animarme siempre a seguir estudiando y aprendiendo sin tener en cuenta la edad y por quererme de manera incondicional, para que nunca perdiera la fuerza y la ilusión.

A todos, MUCHAS GRACIAS

Financiación

El presente Trabajo ha sido posible gracias a la financiación y colaboración de los organismos públicos y privados que se detallan a continuación:

Proyectos de Investigación

“Incorporación de hongos parasitoides autóctonos a piensos comerciales para prevenir la Infección de animales de renta”, Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015).

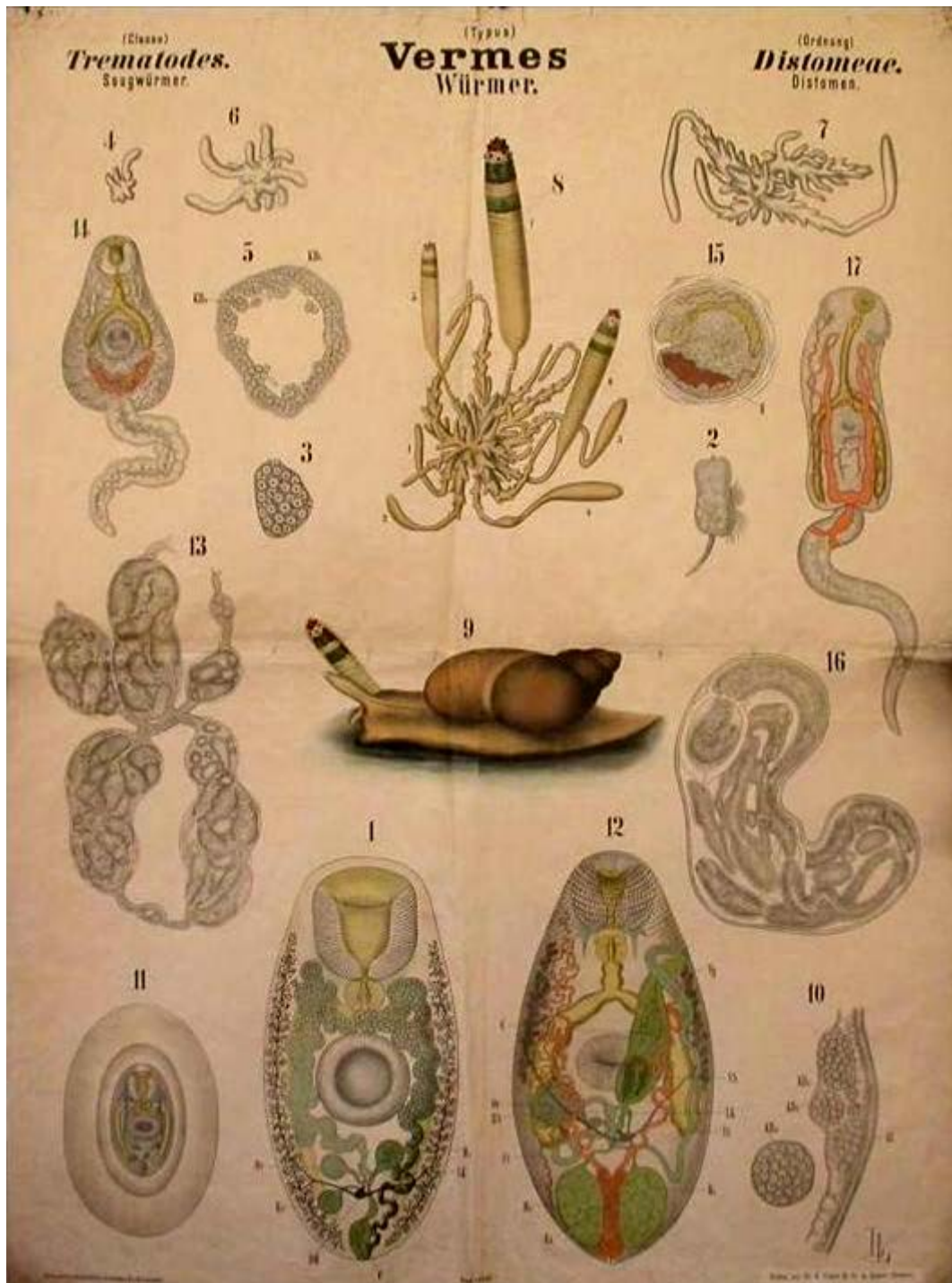
“Desarrollo de ganadería ecológica: de la sostenibilidad a la inclusión social”, Consellería de Economía e Industria, Xunta de Galicia (2010-2012).

Contratos de Investigación

"Aplicación de técnicas de proteómica a la investigación en Parasitología veterinaria", CELTA INGENIEROS (A Coruña) (2008-2010).

ÍNDICE

	Pág
1. ANTECEDENTES	1
1.1.- Climatología del Uruguay	4
1.2.- Manejo del ganado vacuno en el Uruguay	6
1.3.- Trematodosis parasitarias del ganado vacuno	7
1.3.1. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Paramphistomum</i> spp.	7
1.3.2. Hospedadores intermediarios de <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Paramphistomum</i> spp	9
1.3.3. Intervención de especies no rumiantes	11
1.4.- Importancia económica y sanitaria de las trematodosis	13
1.4.1. <i>Fasciola hepatica</i>	13
1.4.2. <i>Paramphistomum</i> spp.	17
1.4.3. Determinación de las pérdidas asociadas a trematodosis bovinas	18
1.4.4. Carácter zoonótico de las trematodosis parasitarias	18
1.5.- Fenología de fasciolosis y parafistomosis en el Uruguay	22
1.6.- Diagnóstico de trematodosis parasitarias	22
1.6.1. Necropsia	25
1.6.2. Clínico	27
1.6.3. Laboratorial	29
1.7.- Control de trematodosis bovinas	33
1.7.1. En el medio	33
1.7.2. Sobre los hospedadores definitivos	36
1.7.3. Control de trematodosis en Uruguay	40
1.7.4. Control práctico de la fasciolosis	41
2. OBJETIVOS	43
3. UNIDAD TEMÁTICA	47
4. PUBLICACIONES	53
4.1.- Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el Departamento de Salto (Uruguay).	55
4.2.- Fasciolosis en ganado vacuno en extensivo de Uruguay y Portugal.	67
4.3.- Infection by paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain.	83
4.4.- The efficacy of four anthelmintics against <i>Calicophoron daubneyi</i> in naturally infected dairy cattle.	93
5. RESUMEN Y DISCUSIÓN	99
6. SUMMARY AND DISCUSSION	111
7. CONCLUSIONES	121
8. CONCLUSIONS	125
9. BIBLIOGRAFÍA	129



1. Antecedentes

Uruguay es un país pequeño (176.215 km²) situado en la zona templada de América del Sur (latitud 30° 5' - 34° 58' Sur, longitud 53° 12' - 58° 43' 40" Oeste). Se trata de una nación netamente agropecuaria, en la que aproximadamente el 70% de las exportaciones corresponden a productos y subproductos agrícolas (URUGUAY SIGLO XXI, 2011).

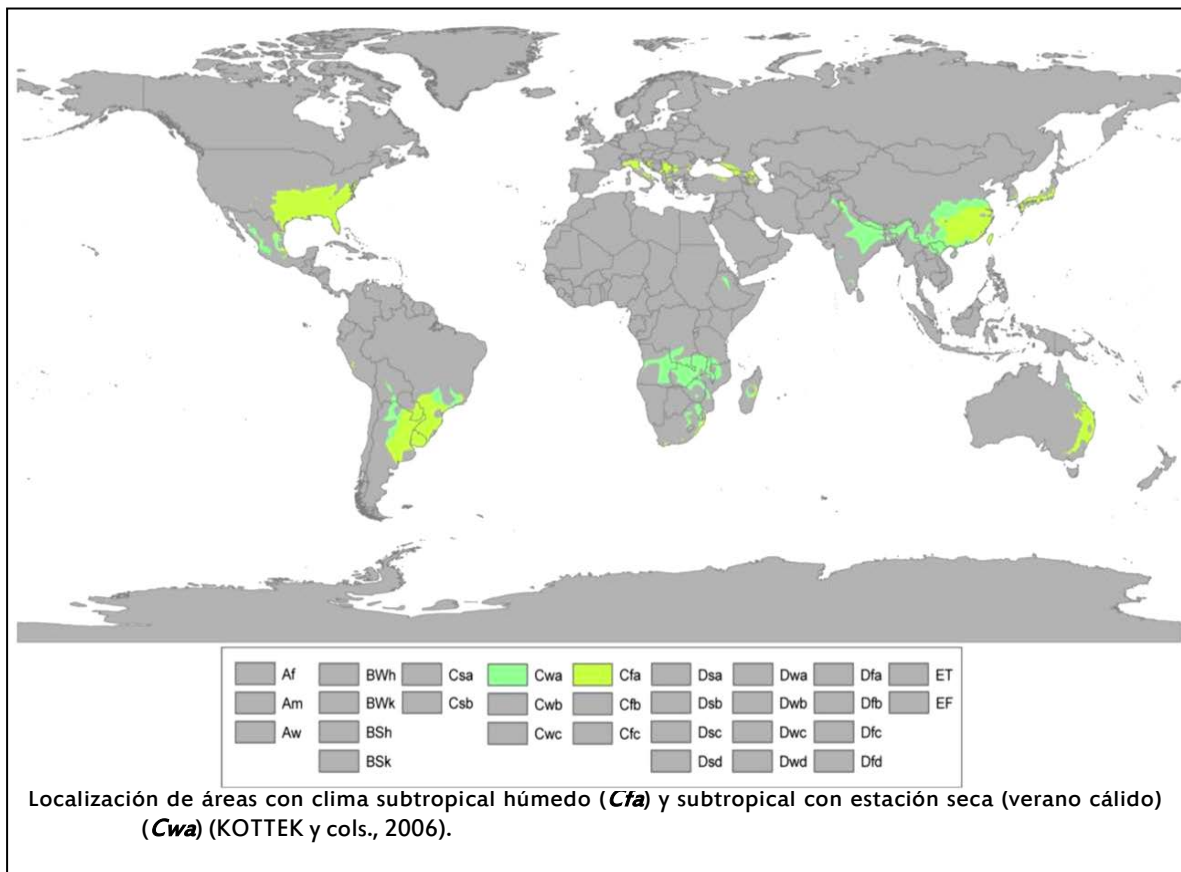
La estimación del censo de la cabaña ganadera señala que hay más de 11 millones de cabezas de bovinos, y casi 10 millones de ovinos. Los antiguos saladeros se modernizaron en el siglo XX para dar cabida a modernas instalaciones desde las que se exporta la apreciada carne de vacuno de Uruguay a distintos destinos en el mundo.

Las explotaciones de vacas lecheras han pasado de abastecer únicamente al consumo local desde los tradicionales tambos, a la situación en el siglo XXI en que Uruguay vende productos lácteos a países europeos. Anualmente, se estima que la ganadería proporciona al país más del 57% del total de las divisas de las que dispone, y a corto plazo se cree que este sector será el único con capacidad de crecimiento y de fortalecer la economía, lo que remarca la importancia de mantener en óptimo estado la salud de los animales.

Este gran desarrollo ganadero en Uruguay es posible en parte porque las especies forrajeras crecen durante prácticamente todo el año, y aseguran la alimentación del ganado vacuno mantenido en pastoreo (SANCHÍS y cols., 2011). Como se explicará en detalle más adelante, las condiciones climáticas y geofísicas del Uruguay favorecen no sólo el crecimiento vegetal, sino también la presencia y supervivencia de algunos agentes parasitarios, entre los que se encuentran los trematodos que pueden infectar a los rumiantes cuando se mantienen en pastoreo, o bien si se les proporciona forraje contaminado por estos helmintos.

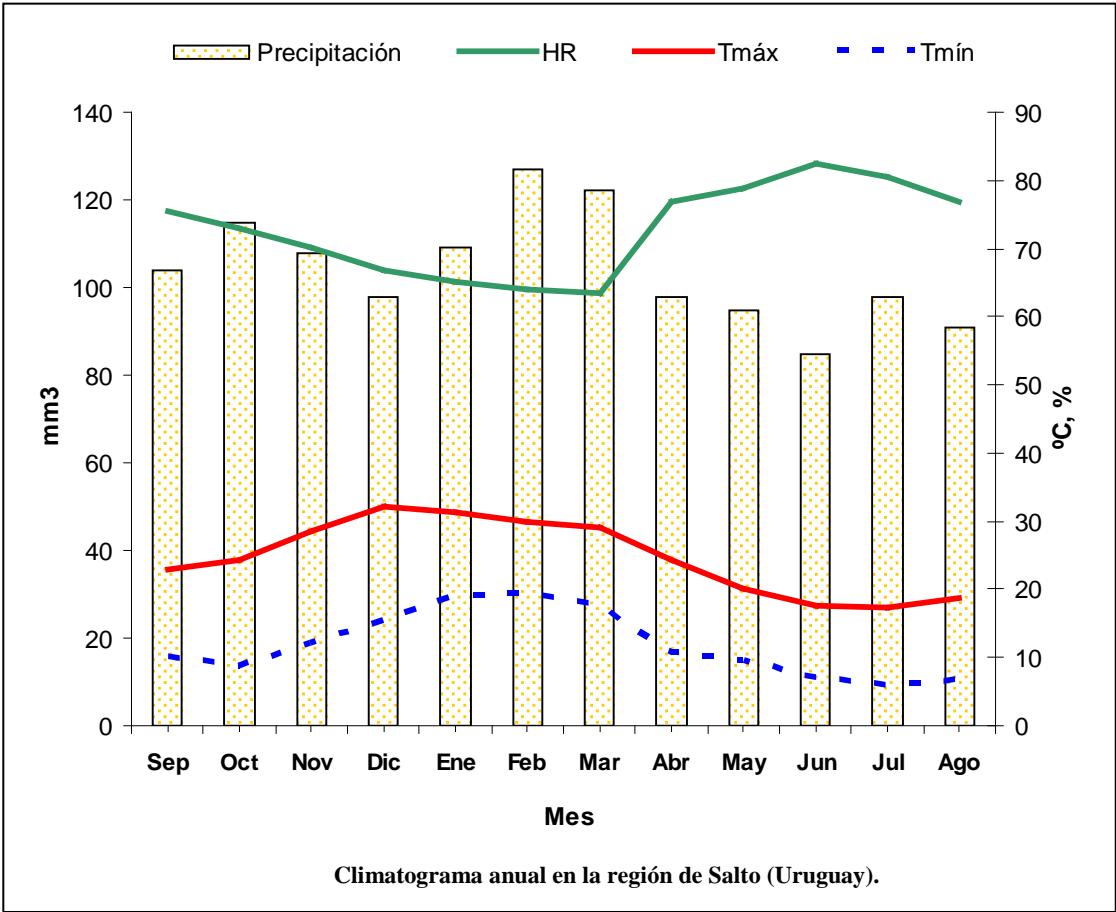
1.1.- CLIMATOLOGÍA DEL URUGUAY

El clima está determinado por la latitud y la influencia de las corrientes marinas del océano Atlántico. En base a la clasificación climática de Köppen, en Uruguay existe un *clima subtropical húmedo* denominado *Cfa*, caracterizado por precipitaciones importantes durante todo el año y pequeñas variaciones estacionales de temperatura (el valor medio supera los 10°C en más de 4 meses) (KOTTEK y cols., 2006). Este clima se describe también en la mitad este de EEUU, sur de Brasil, centro de Argentina, Sudáfrica oriental, China sudoriental y oriental, sur de Japón y Australia sudoriental y oriental. En Europa se detalla en áreas del interior noreste de la Península Ibérica, norte de Italia, costa de Croacia, Eslovenia, Serbia, la costa del mar Negro, Bulgaria, Rumanía y Ucrania.



La inexistencia de barreras geográficas provoca que prácticamente no se detecten diferencias en las condiciones climáticas que concurren a lo largo del Uruguay (ELEPHATHERATOS y cols., 2011). El extremo noroeste del país (Artigas, Salto, Rivera) es más cálido con una media de entre 18-19 °C y un promedio de precipitaciones de unos 1400 mm anuales, mientras que el Sur y Este (Montevideo, Maldonado, Rocha, Lavalleja) son más frescos con una media de alrededor de 16 °C y 1000 mm anuales.

En el siguiente climatograma se presentan los valores de precipitación, temperatura y humedad relativa entre septiembre de 2011 y agosto 2012, en la región de Salto (Uruguay). Se puede observar que las temperaturas no son extremas. La temperatura media osciló entre los 32°C en primavera-verano y 6°C en invierno (julio). Las precipitaciones se distribuyen uniformemente durante todo el año, detectándose los valores más elevados al final del verano (febrero) y los más bajos en otoño (junio) (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, 1971; DIRECCIÓN NACIONAL DE METEOROLOGÍA - URUGUAY, 2008). A excepción de los meses estivales, la humedad relativa supera el 70%.



1.2.- MANEJO DEL GANADO VACUNO EN EL URUGUAY

En Uruguay hay aproximadamente 48.000 explotaciones ganaderas que ocupan 5.000.000 ha., de las cuales, aproximadamente el 90% son pasturas naturales (DIEA, 2011). Los predios agropecuarios comerciales dedicados a la producción de carne tienen vacas de raza Hereford, Angus y Cruces; los de producción láctea vacas Frisonas, y en aquellos en los que la producción es mixta las vacas suelen ser de raza Normanda.

El manejo del ganado vacuno en el Uruguay es similar para todas las razas consideradas, los animales se mantienen en pastoreo prácticamente todo el día en régimen extensivo o semiextensivo por lo que tienen acceso para beber en las aguadas naturales de aquellos potreros que las poseen. La alimentación se suplementa con concentrados de continuo o en alguna época del año.

Durante el verano, ante la escasez de los pastos, el ganado de producción láctea (frisón) aprovecha praderas que se mantienen verdes (generalmente se trata de áreas encharcadas) y beben directamente de regueros o pequeños canales siguiendo un esquema de rotación de pastos mañana-tarde. Estos animales también beben cuando llegan a la sala de ordeño, generalmente en bebederos de agua potable.

1.3.- TREMATODOSIS PARASITARIAS EN GANADO VACUNO

Hasta la fecha, en el Uruguay se han identificado los trematodos parásitos *Fasciola hepatica* y algunas especies del género *Paramphistomum* (*Balanorchis anastrophus*, *Paramphistomum cervi*, *P. explanatum*, *P. microbothrium*, *P. liorchisson*, *P. ichikawai* y *P. leydeni*) (BACIGALUPO, 1942; Malfatto y cols., 1982; ACOSTA y cols., 1989).

F. hepatica también se conoce en el Uruguay y Argentina como *sobaypé* o *saguaypé* (de origen guaraní que significa: gusano plano), es uno de los parásitos más frecuentes en el ganado. Observaciones realizadas en el año 2008 señalan que más del 37% de los hígados de bovinos se decomisan por fasciolosis; sin embargo se desconoce la prevalencia de la paramfistomosis, así como la epidemiología de estas trematodosis en el Uruguay.

Ambos trematodos desarrollan en el ambiente una fase del ciclo idéntica, y precisan de hábitats húmedos con vegetación, por lo que existen notables posibilidades de infección mixta. La similitud entre los huevos de ambos parásitos puede llevar a un diagnóstico erróneo y en consecuencia al tratamiento inadecuado (ARIAS y cols., 2009; PINEDO y cols., 2010). Nunca se han detectado infecciones por *Dicrocoelium* sp. ni por *Schistosoma* sp.

1.3.1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum* spp.

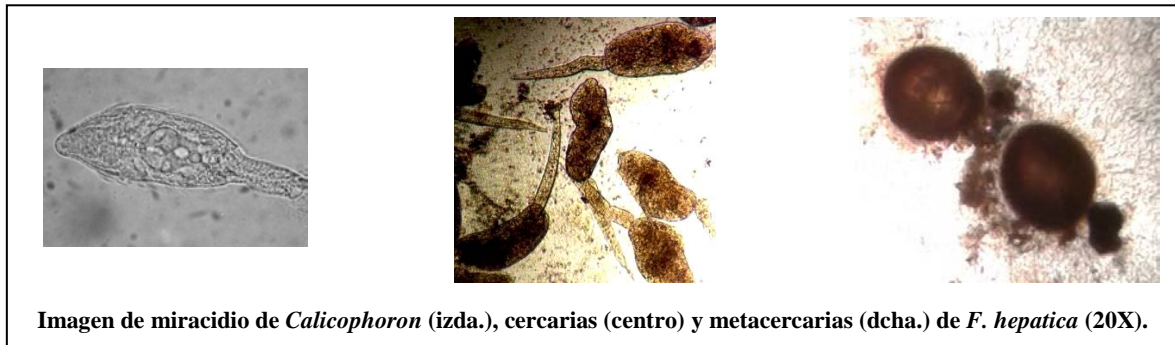
El ciclo biológico de *Fasciola* se caracteriza porque los hospedadores definitivos albergan **individuos adultos** en los conductos biliares hepáticos y vesícula biliar, que eliminan **huevos** que son transportados con la bilis hasta las heces, y de este modo salen al exterior (ROJO-VÁZQUEZ y cols., 2012). Los paramfistomos adultos se encuentran principalmente en el rumen y retículo, y liberan huevos que salen al exterior con las heces (ABROUS y cols., 2000). En ocasiones resulta un poco difícil diferenciar los huevos de los dos trematodos, lo que puede llevar a un diagnóstico incorrecto (MAGE y cols., 2002).

La fase exógena del ciclo de *F. hepatica* y *Paramphistomum* spp. es idéntica, y pueden compartir el hospedador intermediario, principalmente caracoles del género *Lymnaea* (DREYFUSS y cols., 2002). En áreas con humedad y vegetación, en el interior del huevo se

Huevos de *Paramphistomum* (arriba) y *Fasciola* (debajo) (20X).



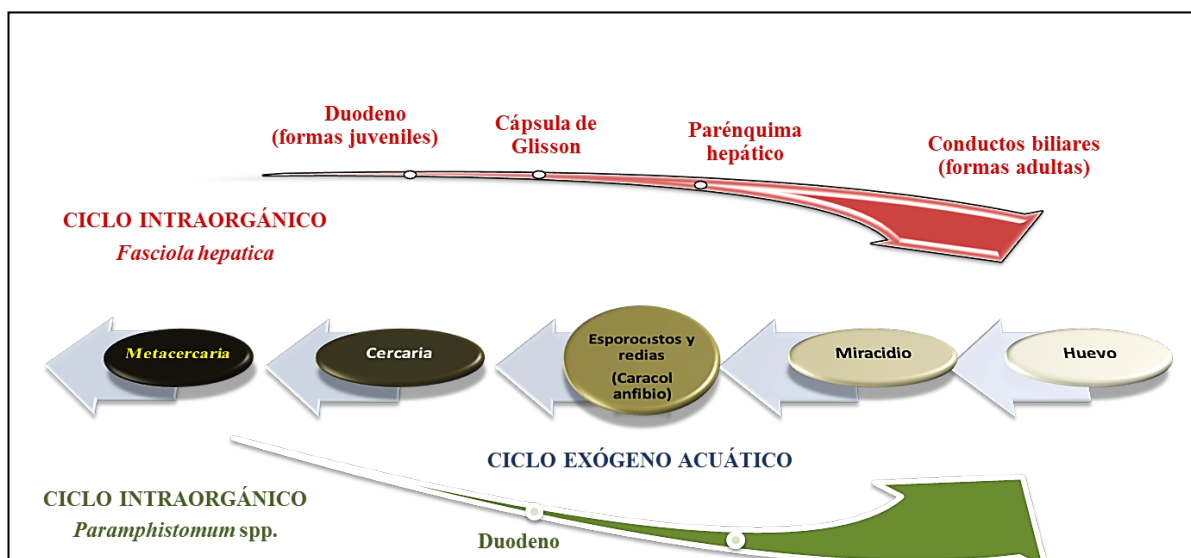
desarrolla un embrión (*miracidio*) que en zonas encharcadas nada de forma activa hasta localizar al hospedador intermediario, un caracol anfibio de la familia Lymnaeidae. Una vez localizado este hospedador, los miracidios penetran a través del pie y completan las fases de *esporocisto*, *redia* y *cercaria* (ABROUS y cols., 2000).



Las cercarias abandonan los caracoles, e impulsándose con la cola, se dirigen hacia especies vegetales que se encuentran en las proximidades, donde pierden el apéndice caudal y se rodean de una cubierta de glicocálix que le confiere una gran resistencia ante condiciones ambientales adversas, convirtiéndose en *metacercarias*, las formas infectivas.

Tras la ingestión de forraje contaminado con metacercarias, llegan al intestino, se desenquistan y siguen una migración intraorgánica diferente. Las fasciolas recién desenquistadas se desplazan a través del peritoneo hasta el hígado (SÁNCHEZ-ANDRADE y cols., 2000). Después de atravesar la cápsula de Glisson, migran por el parénquima hepático hasta los conductos biliares principales y vesícula biliar, en donde se desarrollan hasta adultos (ABROUS y cols., 1999).

Después de desenquistarse en el duodeno, las fases juveniles de *Paramphistomum* spp se fijan y alimentan en dicha localización durante aproximadamente seis semanas, antes de desplazarse hacia los preestómagos donde alcanzan la madurez sexual (URQUHART y cols., 2001).



1.3.2. Hospedadores intermediarios de *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum* spp.

Ejemplares de *G. truncatula*.



Hasta el momento, sólo se han realizado estudios sobre la ecología de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios de *F. hepatica* (NARI y cols., 1986; CASTRO y cols., 2002).

En el continente europeo, los caracoles anfibios que intervienen con mayor frecuencia como hospedadores intermediarios de *Fasciola* son ejemplares de *Galba* (*Lymnaea*) *truncatula*, aunque también se han señalado otras especies de caracoles de la misma familia (*Lymnaeidae*) (*Gastropoda: Basommatophora*) como hospedadores intermediarios (PANTELOURIS, 1965; VIGNOLES y cols., 2006; CARON y cols., 2007; DREYFUSS y cols., 2012).

En países de Sudamérica como Argentina, Colombia, Venezuela o Uruguay se han descrito diferentes especies de limneidos. El primer informe acerca de una especie de *Lymnaea* (*L. viatrix*) en el Uruguay (Carmelo) fue elaborado por el Prof. DOELLO JURADO en 1916, quien encontró una gran cantidad de especímenes en un pantano cerca del río Uruguay (BACIGALUPO, 1942). Posteriormente se observaron ejemplares de *L. viatrix* infectados por

F. hepatica en el río Santa Lucía (a 80 km. de Montevideo), corroborando que al igual que en Argentina, esta especie de caracol actuaba como hospedador intermediario (BACIGALUPO, 1941).

Caracoles *L. viatrix*.



En 1975 se llevó a cabo una consultoría sobre la fasciolosis en Uruguay apoyada por la FAO, en el que se señaló la necesidad de mantener una colonia de *L. viatrix* en el laboratorio para estudiar su biología y tratar de explicar su relativa ausencia en el campo (confirmado mediante visitas a diferentes predios) (OLLERENSHAW, 1975). De la comparación del ciclo de *L. viatrix* y *L. truncatula* se demostró que ambas son morfológicamente indiferenciables, y que requieren las mismas condiciones de humedad en el laboratorio. Sin embargo, se pusieron en evidencia algunas diferencias sobre la temperatura a la que cada una se mantiene activa. Al inicio de la sequía *L. truncatula* permanece en donde está y estiva, mientras que *L. viatrix* se entierra un poco en el lodo, se de forma similar a *L. tormentosa*, pero a diferencia de esta lo hace en grupos. Estas observaciones sostienen la dificultad para encontrar individuos de *L. viatrix* en el campo. Pese al conocimiento previo de la presencia de *L. columella*, hasta 1993 no se encontraron ejemplares infectados (HEINZEN y cols., 1994).

En una granja de Paysandú donde la fasciolosis es endémica, se encontraron caracoles *L. columella* y *L. viatrix* en el lodo y en las rocas, y de *L. columella* en un nicho más acuático, adheridas a la vegetación flotante o semi sumergidos. Estos limneidos contenían un número variable de cercarias de *F. hepatica*, muy reducido en *L. columella* (máximo 10) y más abundante en *L. viatrix* (100-200 cercarias). Se concluyó que ese hábitat particular, *L. viatrix* era la especie de importancia epidemiológica (HEINZEN y cols., 1994), lo que corrobora los resultados obtenidos tras infecciones experimentales de caracoles con ambas especies en el laboratorio **Miguel C. Rubino** (laboratorio oficial veterinario de Uruguay) (CARDOZO y NARI, 1987).

Algunas investigaciones demostraron la presencia de *L. columella* en 14 de los 19 departamentos del país (OLAZARRI, 1985, 1988). Sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que *L. viatrix* es la especie más importante desde el punto de vista epidemiológico (CARDOZO y NARI, 1987).

Pese a que *L. viatrix* y *L. columella* han sido las únicas especies de *Lymnaea* descritas hasta la fecha, no se puede afirmar con rotundidad que sean los únicos limneidos presentes, ya que son muy difíciles de diferenciar por las características morfológicas, lo que genera mucha confusión, siendo primordial el estudio genético de las especies para diferenciarlas (BARGUES y cols., 2006; BARGUES y cols., 2007).

En la región de Salto se colectaron caracoles en 3 predios que previamente fueron positivos a ambas trematodosis. Se recogieron 317 caracoles *Lymnaea viatrix* y 66 caracoles pertenecientes a la familia Planorbidae, identificándose como *Drepanotrema depressissimum*, *D. heloicum* y *Biomphalaria peregrina*. Tras el aplastamiento de los limneidos de mayor tamaño, sólo uno de ellos contaba con formas larvales de *F. hepatica*, mientras que ninguno de los planórbidos estaba infectado por

Paramphistomum. Estos resultados resaltan el elevado riesgo de infección por trematodos en el ganado vacuno del Uruguay, y la necesidad de considerar la aplicación de medidas que complementen el tratamiento de los animales, para el control de estas parasitosis.

1.3.3. Intervención de especies no rumiantes

a) Equinos

Desde el punto de vista económico el uso de la tracción animal en un predio tiene gran importancia, el caballo proporciona al agricultor un sistema de trabajo práctico, de fácil manejo y de bajo costo para la ejecución de las labores agrícolas.

Equinos y rumiantes comparten con frecuencia pastos en el Uruguay.



Se cifra en 414.990 el censo de equinos en el Uruguay (SNIG-MGAP, 2007), la mayoría pastan junto con los rumiantes porque constituyen la manera tradicional para arrear el ganado vacuno y ovino en todo el país. Existen muy pocos datos acerca su importancia en la epidemiología de la fasciolosis, quizás debido a que en los mataderos del Uruguay es frecuente eliminar los hígados de los caballos sin inspección previa.

Los caballos no son hospedadores idóneos para *Fasciola*, y con frecuencia sólo un pequeño porcentaje de parásitos ingeridos es capaz de llegar hasta el estadio adulto, después de un periodo prolongado de tiempo (16-22 semanas) (SOULÉ y cols., 1989). A pesar de esta resistencia a la infección, en algunos países se citan prevalencias de hasta 86% (OLAECHEA, 1993).

La primera comunicación del parásito en los caballos en Uruguay fue hecha por AMARO y cols., en 1987. En 1988 se llevó a cabo un estudio en 258 equinos SPC (Pura Sangre de Carreras) de diferentes yeguas, y por sedimentación simple se encontraron 3 positivos (AMARO y cols., 1992).

Los últimos datos de los que se dispone, señalan que durante la inspección de hígados en un matadero equino, 3 de 114 vísceras tenían fasciolas vivas (media= 8) (GAYO, 2008; datos no publicados).

b) Animales silvestres

Fasciola tiene poca especificidad por su hospedador definitivo, y aunque su presencia es más frecuente en herbívoros, se ha descrito en omnívoros, entre los que se encuentran animales salvajes. WOLFFHUGEL (1916), describió la infección por *F. hepatica* en un carpincho (*Capibara hydrochaeris*).

Estudios más recientes informan de la presencia de huevos de *F. hepatica* y de *Paramphistomum* en las heces del "venado de las pampas" (*Ozotoceros bezoarticus*) (GAYO, 2009; datos no publicados). Estos autores también observaron huevos de *F. hepatica* en las heces de *Myocastor coypus* (GAYO y cols., 2011). Por el momento, el rol que estos animales desempeñan en la epidemiología de la enfermedad es desconocida.

1.4.- IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SANITARIA DE LAS TREMATODOSIS

El distoma hepático se conoce por los agricultores uruguayos desde hace mucho tiempo, pero prácticamente no se dispone de información acerca de la parafistomosis. En el año 1878, DE LUIS OTIN informó por primera vez de la presencia de *Fasciola* en Uruguay. Este médico realizó la necropsia de algunos bovinos que morían en el departamento de San José y comprobó que estaban infectados por este parásito. En su informe detalló una enfermedad hepática, y el hallazgo, en la mayoría de los hígados, de un parásito cuya descripción se corresponde con *Fasciola*. La primera mención de fasciolosis en ovejas data de hace más de 80 años (RUBINO, 1927).

1.4.1. *Fasciola hepatica*

No resulta sencillo estimar las pérdidas económicas atribuibles a las trematodosis parasitarias, y en el Uruguay sólo se dispone de información de la prevalencia e impacto de la fasciolosis. Atendiendo a la intensidad de la infección, las pérdidas se clasifican en *evidentes* y *difíciles de apreciar* (WEHRLE y RICHARDS, 1989; RANGEL y MARTÍNEZ, 1994; OLAECHEA, 2004).

Pérdidas evidentes

Las pérdidas evidentes, como las muertes y la confiscación de los hígados bovinos en la faena debido a la presencia de *duelas hepáticas* o lesiones causadas por ellas, son apreciadas por los productores y veterinarios, y en realidad corresponden a una pequeña parte de las pérdidas totales que se achacan a este parásito. CARBALLO POU, en el año 1929, tras la inspección de 7.735 hígados de novillos observó fasciolas en el 62,1% de los mismos.

Durante el período 1972-1973 se analizó la distribución geográfica y la prevalencia de *F. hepatica* en el ganado vacuno en el Uruguay. El estudio se realizó en 8 mataderos distribuidos por todo el país, después de examinar 110.962 hígados de novillos se decomisaron 58.693 por fasciolosis, resultando una prevalencia del 52,9%. En cuanto a la distribución geográfica de la infección, se concluyó que Uruguay es un área enzoótica de fasciolosis con algunas zonas más problemáticas (NARI y CARDOZO, 1976).

En 3 mataderos inspeccionados en el año 1978 se registró un 59,07% de prevalencia, datos que revelan la importancia de esta trematodosis en el ganado vacuno (OLIVERA y SUPPARO, 1979).

En la Tabla 1 se observa el porcentaje de hígados decomisados por *F. hepatica* en el período 1990-1994, según datos aportados por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (BOLETÍN DE MERCADO MAYORISTA, 1994).

Tabla 1.- Hígados de bovinos y ovinos decomisados por <i>F. hepatica</i> en el Uruguay (1990-1994).		
Hígados decomisados	Bovinos	Ovinos
1990	56,80%	37,58%
1991	66,00%	45,03%
1992	63,97%	34,74%
1993	27,50%	8,19%
1994	20,32%	14,45%

En establecimientos agropecuarios la prevalencia de *F. hepatica* es siempre superior en bovinos que en ovinos, lo que podría deberse al comportamiento etológico diferencial de ambas especies, en donde el bovino tiende a pastorear áreas más húmedas y bajas que el ovino.

Estudios realizados entre 2007 y 2008 en vacuno adulto, indican que el porcentaje de hígados decomisado con fasciolosis fue del 37,4% (CASTRO y BRITO, 2008). El porcentaje resultó más bajo cuando el estudio se realizó en mataderos que faenan animales de todas las edades. En los 6 primeros meses de 2008, de 1.171.988 bovinos y 761.276 ovinos inspeccionados, la prevalencia de fasciolosis fue del 33% y 21%, respectivamente (MUNYO, comunicación personal, DIVISIÓN INDUSTRIA ANIMAL-DGSG-MGAP, 2009).

Pérdidas difíciles de apreciar

Son aquellas relacionadas con mermas en la productividad por reducción en la ganancia de peso, de producción de leche, menor eficiencia en la conversión alimenticia, o reducción de la fertilidad.

Las pérdidas económicas causadas por estas parasitosis no se han determinado para Uruguay, pero en base a la alta prevalencia y diferentes aspectos relacionados con el impacto económico de la enfermedad (decomiso de hígados, muertes, reducción en la producción de lana y leche, infecciones bacterianas secundarias), podemos asumir que son muy importantes. Algunos estudios sostienen que la

infección por *F. hepatica* provoca **disminución del apetito** (FERRE y cols. 1994), pero existen investigaciones en las que no se observó **pérdida de peso** en animales parasitados (CARDOZO y cols., 1991; LÓPEZ-DÍAZ y cols., 1998).

Mediante infecciones experimentales, otros investigadores señalan que las variaciones en la ganancia diaria de peso son superiores al 6% si se trata de infecciones leves (hasta 50 fasciolas), y que pueden llegar al 28% en animales infectados con más de 1000 metacercarias (HOPE-CAWDERY y cols., 1977).

DARGIE (1987) señaló el efecto positivo del **tratamiento fasciolicida** sobre el crecimiento de los animales al comprobar que animales que tenían cargas parasitarias de 30-80 fasciolas después de la desparasitación aumentaban de peso entre 0,2 y 0,7 Kg semanales en relación con los que no recibían tratamiento.

Para OLAECHEA (2004), en las vacas el curso de la enfermedad es lento y las pérdidas en producción pasan generalmente inadvertidas (menor conversión alimenticia y producción láctea), aunque en los bovinos en crecimiento la reducción en la ganancia de peso puede ser de 0,07 y 1,2 Kg por semana dependiendo de la carga parasitaria.

La infección por *F. hepatica* también tiene un efecto deletéreo sobre la **producción y la calidad de la leche**, que depende de la carga parasitaria. ROSS (1970) indicó que la producción de leche puede disminuir hasta un 14%, aunque se puede recuperar un 8% después de un tratamiento fasciolicida. Se han asociado disminuciones de la producción del orden de 90-300 Kg/lactación con infecciones por *F. hepatica* (HORSCHNER y cols., 1976; RANDELL y BRADLEY, 1980). También se ha relacionado este trematodo con la disminución de sólidos totales en la leche, lo que da lugar a una menor calidad, que significa un precio de venta más bajo (BLACK y FROYD, 1972).

Los efectos de la parasitación sobre la **reproducción** pueden ser importantes como señalan OAKLEY y cols. (1979), quienes encontraron alteraciones en los índices de fertilidad en ganado vacuno infectado por fasciolas o tratado de forma inadecuada. MAGE (1990) observó que después de un tratamiento fasciolicida el porcentaje de hembras gestantes en la primera inseminación artificial aumentaba desde un 38% hasta un 66%.

LÓPEZ-DÍAZ y cols. (1998) infectaron experimentalmente terneras y comprobaron que la infección por *F. hepatica* afectaba de forma significativa las concentraciones séricas de progesterona y estradiol,

poniéndose en evidencia un retraso significativo en el comienzo de la pubertad en terneras infectadas en comparación con las testigos.

En EEUU, JOHNSON (1991) señaló un aumento del 8% en la ganancia de peso en terneros en pastoreo que se trataron con un fasciolicida, mientras que en Bélgica, GENICOT y cols. (1991) comprobaron en los terneros tratados un aumento del 18% en la ganancia de peso; según estos autores, los beneficios económicos de la mayor productividad obtenida después del tratamiento fueron 4,2 veces superiores que los costes de dicho tratamiento. KAPLAN (1994) señaló una ganancia de peso de 8,2 - 10,8 Kg en animales tratados, y comprobó un aumento en el número de terneros nacidos de entre el 1% al el 3%, que pesaban entre 13,6 y 20,4 Kg más que los paridos por vacas no tratadas, por lo que la ganancia neta considerada oscilaría entre 15,19 y 31,01 dólares por vaca de cría. MARLEY y cols. (1996) señalaron una ganancia de peso de 12,9 Kg en terneros tratados frente a *F. hepatica*.

Entre los años 2007 y 2010, SANCHÍS y cols. (datos no publicados), desparasitaron mensualmente con triclabendazol terneros y vacas adultas que eliminaban huevos de *F. hepatica*. No observaron diferencias en la ganancia de peso en relación con animales de las mismas características que no recibieron el antihelmíntico. Algunos de estos animales se siguieron hasta su faena, encontrándose lesiones y fasciolas vivas en los canalículos de los no tratados, y solo lesiones en los tratados.

La repercusión económica de la fasciolosis sobre el ganado vacuno queda patente en el estudio que GONZÁLEZ y cols. (2007) realizaron en Cuba durante cuatro años, concluyeron que esta trematodosis provocaba pérdidas por un total de 517.550\$, de los cuales correspondía un 3% al decomiso de hígados (en kilogramos superó las 6 toneladas), 61% a la disminución en producción de leche (1,5 millones de litros), un 33% por disminución en la producción de carne (38 toneladas) y un 3% por el coste de antiparasitarios. La tasa de infección en todos los años fue superior al 30%.

Estos trabajos deben llevarnos a la conclusión de que *F. hepatica* es un parásito de importancia económica en los predios de ganado vacuno. Incluso ante intensidades de infección bajas, el hígado en el matadero seguiría siendo decomisado con las pérdidas económicas respectivas. En bovinos con carencias en la alimentación, podría llegar a ser un problema importante, más aún si se trata de animales de alta producción (ganado lechero). También es bien sabido que las condiciones de anaerobiosis generada por este parásito en el hígado, facilita algunas infecciones bacterianas secundarias, tales como *Clostridium haemolyticum* (OLAECHEA, 1993).

1.4.2. Paramphistomum spp.

Atendiendo a la definición de la OMS, la parafistomosis es una enfermedad emergente puesto que se ha incrementado el conocimiento de su difusión: en los últimos años se ha diagnosticado en diferentes países europeos como Italia, Francia o España, y americanos como México o Argentina, obteniéndose porcentajes que oscilan entre el 11% y el 40% (SANABRIA y cols., 2009; ARIAS y cols., 2011).

Además se ha comprobado que la prevalencia de parafistomosis sigue aumentando, por ejemplo, en Francia, durante el periodo 1990-1999, la prevalencia de parafistomosis pasó del 5,2% al 44,7%, en tanto que la de fasciolosis no experimentó variaciones (SMIZDT-ADJIDÉ y cols., 2000; MAGE y cols., 2002).

En algunos estudios se ha postulado que una de las causas responsables del incremento de vacas con parafistomosis es la administración de tratamientos fasciolicidas eficaces, mientras que no está muy extendida la utilización de productos de acción parafistomicida (MAGE, 1990).

Los parafistomos como *Paramphistomum* y *Cotylophoron* producen grandes pérdidas económicas al disminuir la conversión alimenticia, pérdida de peso corporal y bajar la producción de leche (KATHOON y cols., 2003). Su efecto es mayor sobre rumiantes jóvenes (terneros, cabritillos y corderos), a los que ocasiona alteraciones digestivas y hemáticas que a veces pueden llegar a provocarles la muerte. Existe evidencia de que estas alteraciones se deben principalmente a los trematodos juveniles, mientras que se discute la patogenicidad de las formas adultas (SILVESTRE y cols., 2000).

HICKS y cols. (1989) realizaron una infección experimental en bovinos y estudiaron la ganancia de peso durante 135 días. Así comprobaron una reducción en la ganancia de peso del 5-9% en los animales infectados, lo que supone alrededor de 6-8 Kg menos de peso en el sacrificio comparado con el grupo de bovinos no infectado. MAGE (1990), señala que el porcentaje de hembras gestantes en la 1ª inseminación artificial aumentaba desde un 38% hasta un 66% después de la desparasitación.

1.4.3. Determinación de las pérdidas asociadas a trematodosis bovinas

Con objeto de facilitar la estimación objetiva de las mermas económicas causadas por *Fasciola*, se han desarrollado diferentes procedimientos matemáticos. En ganado lechero en Suiza se estimaron las

pérdidas económicas atribuibles a *F. hepatica* usando un modelo simple de hoja de cálculo para sumar las pérdidas individuales. Debido a que existe una variabilidad sustancial en estas pérdidas de producción, se utilizaron técnicas de muestreo de Monte Carlo para modelar esta variabilidad (SCHWEIZER y cols., 2005). A cada partida de costes y cada elemento de datos relacionados con la prevalencia de *F. hepatica* se le asignó una distribución matemática que tiene en cuenta la variabilidad de los datos experimentales y / o el tamaño de la muestra de los datos. Después de realizar un total de 10.000 simulaciones, los resultados sugirieron una pérdida económica media anual de aproximadamente 52 millones de euros en Suiza, lo que representa una pérdida media de 299€ por animal infectado. La mayor parte de las pérdidas se deben a la reducción de producción de leche y de la fertilidad, y en menor grado por la disminución de producción de carne y decomiso de los hígados.

Más recientemente, se ha descrito una hoja de cálculo (ParaCalc[®]) que proporciona una estimación de los costos de las infecciones por *F. hepatica* y nematodos gastrointestinales sobre la producción en animales jóvenes y animales adultos. La información recabada con la anamnesis del rebaño, el examen clínico de los animales, el análisis de los registros de producción y los parámetros de diagnóstico, sirve para evaluar la importancia de las infecciones por helmintos en un rebaño y definir las medidas de control del rebaño (CHARLIER y cols., 2012). Aplicando ParaCalc[®] a 93 rebaños belgas resultó en una estimación mediana de 6\$ de pérdidas por vaca parasitada por trematodos hepáticos.

1.4.4. Carácter zoonótico de las trematodosis parasitarias

Se estima que la infección humana por *F. hepatica* afecta en la actualidad a alrededor de 10 millones de personas y que cientos de millones están en riesgo de contraerla, por lo que ha sido considerada como una enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (MAS-COMA y cols., 1999).

El cuadro patológico en el hombre es similar al que se describe en los rumiantes, los hospedadores definitivos más habituales. Cuando las metacercarias llegan al intestino y se desenquistan, penetran en la mucosa del intestino provocando Petequias y focos de inflamación local. Una vez que atraviesan el peritoneo y alcanzan la cápsula de Glisson, migran a través del parénquima hepático provocando graves hemorragias e intensa lesión tisular. Finalmente, las fasciolas llegan a su localización definitiva, los conductos biliares. La infección por *Fasciola* provoca en el hombre la aparición de dolor epigástrico, fiebre, eosinofilia, artralgia, mialgia, náuseas, pérdida de peso y prurito (SABA y cols., 2004).

En América Latina, en especial en Bolivia, Perú y Cuba se citan las mayores prevalencias de fasciolosis humana del mundo, pero son pocos los casos reportados en Uruguay, y siempre se trata de hallazgos accidentales en actos quirúrgicos o en exámenes coproparasitarios (LÓPEZ-LEMES y cols., 1996).

Entre 1909 y 2003, casi 100 años, sólo se notificaron unos 90 casos de pacientes con fasciolosis (LÓPEZ y cols., 1990). Teniendo en cuenta que no es una enfermedad de declaración obligatoria a las autoridades sanitarias, la Sociedad de Medicina del Uruguay, reconoce la posibilidad de que exista un subdiagnóstico importante

La enfermedad fue descrita por primera vez en Uruguay en pacientes aquejados de fuerte dolor en el hipocondrio derecho y en los que se encontraron fasciolas al extirpar la vesícula biliar (CALZADA, 1909, GAMINARA, 1929). Durante las siguientes décadas, se han descrito otros casos por el hallazgo de huevos en las heces y la bilis (ETCHECHURRY, 1935; MACKINNON, 1948).

Tradicionalmente se ha defendido que el origen de la trematodosis en pacientes humanos se debía a la ingestión de algunas verduras con metacercarias, en especial de berros (*Nasturtium officinale*) (RAMOS HERRERA, 1950; ROJO-VÁZQUEZ y FERRÉ, 1999). En algunas investigaciones se ha afirmado que la infección puede producirse al beber agua con metacercarias, o también por la utilización de utensilios de cocina insuficientemente limpiados (MAS-COMA y cols., 1999), e incluso mediante la ingestión de jugos elaborados con agua con metacercarias (APT y cols., 1993).

En Uruguay están documentados dos brotes de fasciolosis humana. El primero, en 1949, afectó a un grupo familiar y fue debido probablemente a la ingestión de berros (RIAL y cols., 1951), el segundo afectó en 1960 a 31 personas y estuvo al parecer relacionado con el agua de bebida procedente de cañadas y arroyos contaminada con metacercarias después de las inundaciones (ABENTE y cols., 1960).

Entre 1991 y 1993, se llevó a cabo la primera encuesta serológica y coprológica en la población rural de 4 departamentos (Artigas, Rivera, Florida y Salto) para determinar la prevalencia de fasciolosis en personas. De un total de 951 muestras analizadas, sólo 2 fueron positivas (LÓPEZ-LEMES y cols., 1996).

En 2003, durante un Congreso Nacional en Uruguay, se describieron 3 casos clínicos de fasciolosis (2 mujeres y 1 hombre) en individuos que habían ingerido berros, y que cursaban con eosinofilia y dolor en el hipocondrio derecho (BURJEL, 2003).

El hecho de que este parásito, con una alta prevalencia en el ganado de Uruguay, tenga tan poca incidencia en los seres humanos resulta difícil de entender. Una explicación podría ser, como se apuntó

anteriormente, a que no es una enfermedad de declaración obligatoria, probablemente también existan casos de confusión con otras patologías y algún error de diagnóstico. Sin embargo, los aspectos socio-económicos del país juegan un papel importante ya que, a pesar de ser fundamentalmente agrícola, la población es esencialmente urbana (más del 91%) y el 98% de la misma tiene acceso al agua potable. Además, el berro no juega un papel importante en la dieta. Todas estas características asociadas a los hábitos de higiene, disminuye la probabilidad de infección humana.

Hasta el momento, en el Uruguay no se han descrito implicaciones zoonóticas de la infección por anfishómidos, es importante tener en cuenta que la especie *Gastrodiscoides hominis* puede afectar tanto a personas como a animales (ROY y TANDON, 1992).

1.5. FENOLOGÍA DE FASCIOSIS Y PARANFISTOMOSIS EN URUGUAY



Las condiciones climáticas del Uruguay favorecen el desarrollo, prácticamente durante todo el año, de especies forrajeras que sirven de alimento a los animales, por lo que el ganado vacuno se mantiene en pastoreo de forma permanente. Este tipo de manejo favorece la infección por diversos parásitos. Las épocas que entrañan mayor riesgo de exposición a

Fasciola y *Paramphistomum* están intrínsecamente relacionadas con la presencia de los hospedadores intermediarios. Fundamentalmente son tres los factores que condicionan la contaminación del pasto con gran cantidad de metacercarias (URQUHART y cols., 2001):

El primero es que existan hábitats para los caracoles, teniendo en cuenta que las limneas prefieren el barro al agua y que sus hábitats permanentes son las orillas de acequias y arroyos y las pequeñas charcas, los suelos arcillosos que permiten retener agua, pero que no son impermeables resultan los más adecuados para la supervivencia de *Lymnaea truncatula* porque el exceso de agua favorece el desarrollo de los caracoles anfibios. Los moluscos viven también en las orillas de riachuelos, abrevaderos, praderas inundadas, etc., es decir, donde hay agua dulce de corriente lenta. El potencial biótico en condiciones ideales es enorme y un solo individuo suele producir hasta 25.000 caracoles de nueva generación en sólo tres meses, principalmente cuando la temperatura es cercana a 22°C, con humedad adecuada. En épocas secas y calurosas, los caracolillos pueden estar, pero en las fuentes, abrevaderos y, sobre todo los regadíos, mantienen altas concentraciones.

El segundo, que es necesaria una temperatura igual o superior a 10°C tanto para la reproducción de los caracoles como para el desarrollo del miracidio dentro del huevo. SIMÓN (1968) comprobó que a temperaturas superiores a 10°C los huevos de *F. hepatica* eclosionan en 30 días.

El tercero es la humedad, las condiciones óptimas de humedad para la reproducción de los caracoles y el desarrollo de los trematodos en su interior se dan cuando las precipitaciones son abundantes y evitan que los charcos se sequen.

Las poblaciones de limneas aumentan desde la primavera hasta el verano, época que representa una barrera importante para el desarrollo de los moluscos porque las altas temperaturas y escasas

precipitaciones favorecen la desecación del terreno, y por tanto, establecen una restricción notable para su supervivencia. Sin embargo, la escasez de pastos en esta temporada obliga a que los animales se alimenten en zonas en las que la presencia abundante de agua asegura el crecimiento del forraje, convirtiéndose de este modo en áreas de riesgo de trematodosis.

Aunque durante el periodo estival las temperaturas son óptimas para el desarrollo de *F. hepatica*, la humedad puede resultar limitante (ACOSTA, 1994). Con el inicio de la sequía *L. truncatula* permanece en su localización y estiva, mientras que *L. viatrix* se comporta de forma similar a *L. tormentosa* y se entierra un poco en el lodo, pero a diferencia de ésta, lo hace en grupos y no de forma individual (OLLERENSHAW, 1975). Estas observaciones parecen explicar la dificultad para encontrar individuos de *L. viatrix* en el campo. A pesar de que la presencia de *L. columela* se publicó muchos años antes, hasta 1993 no se encontraron ejemplares infectados naturalmente (HEINZEN y cols., 1994). La emisión de cercarias durante el verano transcurre en aproximadamente 37 días después de la infección del caracol, lo que sugiere que *Fasciola* en la primavera sincroniza su ciclo dentro del hospedador intermediario, acortando paulatinamente los tiempos de emisión (CARDOZO y NARI, 1980).

Caracoles *L. viatrix*.



En el otoño (marzo-abril) los caracoles que sobrevivieron al verano en zonas permanentemente húmedas o enterrados en el barro, son los responsables de mantener la infección por *F. hepatica*. Debido a que las condiciones de humedad se hacen más favorables, surgen nuevas infecciones en los prados (ACOSTA y cols., 1989). Durante esta estación el ciclo se va ralentizando paulatinamente, siendo cada vez menos eficiente en la emisión de cercarias (ACOSTA, 1994). Los moluscos infectados en otoño-invierno, con temperaturas máximas por debajo de 20°C y mínimas inferiores a 10°C, tardan 4-8 meses en emitir cercarias. Estos datos señalan que la temperatura regula la estacionalidad de la infección, y la humedad determina su severidad (RONDELAUD y cols., 2013). También demuestran que el parásito es capaz de sincronizar su desarrollo con el del hospedador intermediario.

Teniendo en cuenta que al final de la primavera aumenta el número de *L. viatrix*, ésta parece ser la explicación al mayor número de animales infectados entre finales de primavera y verano. CASTRO y cols. (2001) indicaron que la prevalencia de infección en caracoles *L. viatrix* era máxima en otoño y primavera y mínima en invierno.

1.6.-DIAGNÓSTICO DE TREMATODOSIS PARASITARIAS

1.6.1.-Necropsia

La mayor parte de los datos obtenidos mediante necropsia de ganado vacuno se limitan a investigaciones puntuales, y no son frecuentes los estudios que abarcan un número elevado de animales (ABUNNA y cols., 2009; BORJI y cols., 2012). El diagnóstico *pos-mortem* se basa en la interpretación de las lesiones y sobre todo en el hallazgo, identificación y recuento de los parásitos que se recuperan.

En bovinos con fasciolosis, llama especialmente la atención el aspecto de los conductos biliares que aparecen engrosados y calcificados; en su interior y en ocasiones también en la vesícula, aparecen fasciolas adultas. Es frecuente el hallazgo de exudado purulento debido a contaminación bacteriana.

En el caso de infección intensa por *F. hepatica* se aprecian cambios en el tamaño (hipertrofia) y color (pardo-amarillento) del hígado. La vesícula también está hipertrofiada y la bilis aparece turbia.

El examen *post mortem* es generalmente necesario para la confirmación de la parafistomosis larvaria aguda. Durante esta fase no hay huevos en las heces y tampoco se acompaña necesariamente por la presencia de trematodos adultos en el rumen.

Los parafistomos juveniles provocan enteritis catarral, que puede tornarse hemorrágica dependiendo del grado de infección, por lo que el contenido intestinal aparece de color café o rojo oscuro por la presencia de sangre.

El examen del rumen debe efectuarse con cautela, ya que a menudo los parafistomos pueden pasar desapercibidos por su situación entre las papilas ruminales.

a) Fasciolosis

Las fasciolas producen con las espinas de la cutícula y las ventosas una intensa irritación de las células epiteliales, modifican su estructura y originan una intensa reacción inflamatoria (PÉREZ y cols., 2002).

Aunque las formas juveniles liberadas del intestino no producen lesiones importantes, se ha descrito inflamación del peritoneo con exudado e infiltrado leucocitario, principalmente de eosinófilos. En la cápsula de Glisson, aparecen focos de hemorragias y de necrosis, engrosamiento e infiltración eosinofílica.

El paso a través del parénquima hepático buscando los conductos biliares y la vesícula, da lugar a la aparición de trayectos hemorrágicos o lagunas hemáticas, que con el tiempo se resuelven con el

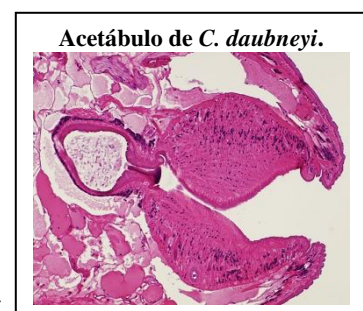
depósito de tejido fibroso (afuncional). A medida que las fasciolas juveniles aumentan de tamaño, la intensidad de la respuesta inflamatoria también se incrementa (BEHM y SANGSTER, 1999).

En la fasciolosis crónica, se observa fibrosis hepática resultado de la reorganización de los trayectos migratorios originados por las fasciolas, y colangitis hiperplásica, por la presencia de los parásitos adultos en los conductos biliares y vesícula. La fibrosis hepática se puede observar en todo el hígado, aunque es más frecuente en el lóbulo ventral por ser preferentemente éste el lugar de entrada de las fasciolas. La colangitis hiperplásica se produce como consecuencia del traumatismo que originan los adultos en la mucosa de los conductos biliares.

Algunas investigaciones señalan que el grado de alteración hepática, caracterizada por cirrosis, fibrosis portal e hiperplasia de los conductos biliares, es más intensa en individuos reinfectados (PÉREZ y cols., 2005). El hígado está aumentado de volumen y peso, y se detectan hematomas y abscesos subcapsulares. Se ha observado necrosis focal hepática con infiltrado de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Se ha registrado la presencia de huevecillos impregnados de bilis, rodeados por un granuloma de células gigantes, células epitelioides y fibrosis periférica. Se sabe también sobre la formación de nodulaciones amarillentas de 0.5 cm de diámetro, así como de zonas de fibroesclerosis periductal y del espacio portobiliar, y dilatación de los conductos biliares intrahepáticos (CARRADA-BRAVO y ESCAMILLA, 2005). El epitelio de la vesícula biliar está erosionado o presenta hiperplasia del tipo pseudoglandular.

b) Paranfistomosis

Cuando los parásitos adultos están adheridos al epitelio del rumen, las papilas aparecen anémicas, muy pálidas en comparación con el color verde grisáceo que rodea al tejido; hay zonas de necrosis debido a la presión provocada por el acetábulo del trematodo. Cuando los paranfistomos se desprenden, se pueden observar las papilas atrofiadas en las puntas y unos botones prominentes que quedan como recuerdo de la presencia del parásito. En el duodeno la capa epitelial y las glándulas de Lieberkuhn están descamadas y necróticas.



Las formas juveniles ejercen acción traumática al perforar la mucosa intestinal, a medida que la emigración avanza, van destruyendo el tejido y aumentando de tamaño. La hiperemia y el edema intestinal pueden provocar oclusión parcial del colédoco, causando retención de

bilis y distensión de la vesícula biliar. El aumento en la concentración de sales biliares produce necrosis del epitelio de la vesícula biliar.

Durante la migración, los ganglios están inflamados y a veces las fases juveniles perforan la pared del intestino. En casos graves hay atrofia de la grasa, hidrotórax, hidropericardio y ascitis. La mucosa del intestino delgado y abomaso está edematosa, inflamada y con petequias.

Cuando llegan a la submucosa del estómago tienen un tamaño considerable por lo que ejercen también una acción mecánica que se traduce en obstrucción de las glándulas.

Microscópicamente: se observa que en el rumen hay proliferación de epitelio estratificado escamoso, en el lugar donde se encuentra el parásito las papilas muestran signos de degeneración e infiltración linfocitaria en la lámina propia.

1.6.2.- Clínico

a) Fasciolosis

La magnitud del cuadro clínico depende del número de metacercarias ingeridas. La fasciolosis hepática puede causar tres cuadros clínicos. La forma aguda se presenta cuando el animal ha ingerido gran cantidad de metacercarias en un corto periodo de tiempo y suele afectar a rumiantes que pastan por primera vez o se enfrentan por primera vez al parásito. Debido a la gran cantidad de fasciolas que al migrar por el hígado provocan trayectos hemorrágicos, se produce un cuadro de anemia de tipo normocítica, normocrómica. En esta fase prepatente, los signos presentes son fiebre, hepatomegalia, eosinofilia, debilidad, palidez de las mucosas, taquipnea o disnea cuando se le obliga a caminar, dolor abdominal y ascitis, el animal puede morir en 12 días o menos. Esta forma clínica es imposible de diagnosticar por exámenes coproparasitarios, ya que los estadios juveniles no producen huevos (etapa prepatente de la infección) (ALCAÍNO y APT, 1989).

La fasciolosis subaguda se debe a la ingesta de un número elevado de metacercarias en un periodo de tiempo suficientemente largo como para no provocar un proceso agudo. Aproximadamente puede haber 1000 parásitos en el hígado entre jóvenes y adultos.

Los animales empiezan a perder peso, se apartan del rebaño, las mucosas aparecen pálidas, puede haber dolor a la palpación abdominal y edema submandibular. Hay anemia hipocrómica y macrocítica.

Normalmente la morbilidad es alta, pero la mortalidad es baja, los animales si llegan a morir, mueren a las dos semanas de postinfección.

La forma crónica se presenta principalmente en animales adultos, cuando la ingesta de metacercarias es baja y muy pocas se desarrollan hasta parásitos adultos (200-250). Existe anemia hipocrómica, pérdida de peso y anemia progresivas, cólico biliar, ictericia, colangitis, pancreatitis y fibrosis hepática. En algunos casos se presenta edema submandibular y diarrea (MARCOS y cols., 2005, 2008).

En los bovinos predomina la forma crónica en los adultos y subaguda en los terneros y pocas veces se presenta la forma aguda. Debido a que, en la mayoría de los casos, los signos clínicos de la fasciolosis son inespecíficos, se necesita la confirmación por necropsia o pruebas laboratoriales.

b) Paranfistomosis

La gravedad de la infección depende del grado de contaminación y de que las condiciones ambientales propicien una cantidad significativa de metacercarias viables. La enfermedad ocurre cuando gran cantidad de formas inmaduras de paranfistomas lesionan la mucosa del intestino delgado causando destrucción e inflamación del tejido. Las manifestaciones clínicas se ponen de manifiesto a las dos semanas post infección, y consisten sobre todo en trastornos intestinales. FOSTER y cols. (2008), describen que los bovinos con paranfistomosis presentan un cuadro de diarreas fétidas y profusas, anorexia, importante pérdida de peso y de proteínas, que pueden conducir a edema generalizado (hidropericardio, hidrotórax, edema pulmonar, ascitis y edema submandibular) e incluso a la muerte. Histológicamente, produce inflamación catarral y hemorragia generalizada en el duodeno y yeyuno, con destrucción de las glándulas intestinales, degeneración de los nódulos linfáticos asociados y otros órganos durante la migración. Estas lesiones van acompañadas de anemia, hipoproteinemia, edema y emaciación (MILLAR y cols., 2012).

FOSTER y cols. (2008) no encontraron asociación entre la intensidad de la infección por *Paramphistomum* y la enfermedad clínica. Señalan que las formas adultas son generalmente bien toleradas, y sólo en infecciones intensas las formas inmaduras pueden provocar enfermedad clínica de los animales jóvenes, y en casos extremos su muerte.

1.6.3.- Laboratorial

a) Coprológico

Se han descrito diferentes pruebas coprológicas, desde simples extensiones hasta laboriosas técnicas cuantitativas, en las que los huevos se concentran por flotación o sedimentación (ROJO-VÁZQUEZ y FERRÉ, 1999). Los métodos de sedimentación son los de elección por su sencillez y simplicidad (ROJO-VÁZQUEZ y cols., 2003) y se basan en que los huevos de los trematodos tienen mayor densidad que los detritus de las heces.

Uno de los protocolos más frecuentemente aplicados para el análisis de heces mediante sedimentación consiste en emulsionar 5 g en agua, filtrar la solución a través de un tamiz de 150 μm y dejar decantar en una copa de sedimentación de 1 L durante 15-20 min (MAFF, 1986). Tras repetir el proceso en otra copa de 500 mL y otra de 150 mL, finalmente se reduce el volumen de la solución a 50 mL, que se examinan en cámara McMaster bajo microscopio óptico (ARIAS, 2007).

En el Uruguay, las muestras de materia fecal se procesan mediante la técnica de sedimentación en tubo a tiempo controlado (HAPPICH y BORAY, 1969), que se basa en que el tiempo de caída de los huevos de *F. hepatica* y *Paramphistomum* en el agua es de 100 mm/minuto, más rápido que el de la caída de detritus de las heces. El tiempo de sedimentación debe de ser de 3 a 4 minutos (máximo). La sedimentación de los huevos puede ser auxiliada con el uso de soluciones jabonosas que ayudan a desprender los huevos de las materias fecales.

En detalle, se colocan 5 gramos de heces en un mortero y se disuelven en 50 ml de agua con unas gotas de solución jabonosa (PARFFIT, 1970). A continuación se pasan por un tamiz de 32 mallas/cm, se recoge el filtrado, se deposita en una probeta y se deja decantar durante 3 minutos.

Transcurrida la sedimentación se procede a eliminar el sobrenadante mediante una bomba de vacío adaptada a una pipeta Pasteur de extremidad curva, y a restituir el volumen en un tubo de ensayo de 30 ml, mediante adición de agua. Se repite este paso una vez más y el sedimento de la última decantación se colorea con unas gotas de azul de metileno al 1% y se vierte en la cápsula de lectura para su examen a la lupa binocular con 12x. La cápsula de numeración o lectura tiene base rectangular de las siguientes dimensiones: 12 x 9 x 0,3 cm y tiene grabados 100 rectángulos (BERDIE y cols., 1978).

La sedimentación entraña algunos inconvenientes para el diagnóstico de trematodosis. Las infecciones leves podrían llegar a

Huevos de *Paramphistomum* (arriba) y *Fasciola* (abajo) (20X).



pasar desapercibidas debido a la escasa eliminación de huevos en heces (SÁNCHEZ-ANDRADE y cols., 2000). Se ha comprobado que si se incrementa la cantidad de heces analizadas de 4 g a 10 g, se consigue aumentar la sensibilidad pero la especificidad disminuye (CHARLIER y cols., 2008). Otro aspecto a destacar es la posibilidad de que se confundan los huevos de parafistómidos con los de *F. hepatica* (PINEDO, 2011).

b) Serológico

Algunos de los inconvenientes de las técnicas coprológicas ya se han mencionado anteriormente. Otro de los problemas radica en que, entre el momento de infección y la aparición de huevos en las heces transcurre un periodo de tiempo (periodo de prepatencia), durante el cual tienen lugar las principales alteraciones patológicas, pero el análisis resulta negativo. Es decir, la presencia de huevos en las heces indica la existencia de trematodos adultos en el animal, pero no ofrece información acerca de la posible presencia de estadios inmaduros.

Sólo en el caso de animales enfermos, con signos clínicos que hagan sospechar de enfermedad parasitaria se realizan análisis coprológicos individuales que permitan establecer el tratamiento. Por el contrario, ante un diagnóstico coprológico positivo, en el que el individuo no muestre signos clínicos o pérdidas claras en la productividad, sigue siendo difícil decidir si la aplicación de un tratamiento antihelmíntico se traducirá en una mejora del rendimiento del animal. Por lo tanto, lo más adecuado es que las pruebas de diagnóstico aporten información acerca de la exposición del rebaño a las infecciones y que esta información se asocie a la *morbilidad* del parasitismo y a la conveniencia de desparasitar los animales de manera conjunta.

El conocimiento de la respuesta inmunitaria que los animales desarrollan frente a los productos antigénicos de los parásitos, supuso un notable avance para detectar dicha exposición mediante la demostración de anticuerpos específicos. A tal fin se han desarrollado diferentes técnicas sero-inmunológicas, persistiendo desde hace algún tiempo el enzimoimmunoensayo o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), mediante el cual la unión del anticuerpo a un antígeno previamente ligado a un soporte sólido (generalmente placas de microtitulación compuestas de polímeros como PVC) se evidencia mediante un cambio de coloración (PACKHAM y cols., 2002). Esta prueba inmunológica permite analizar al mismo tiempo 88 sueros por placa, lo que facilita la obtención de resultados del rebaño.

La aplicación de pruebas serológicas para la detección de infecciones por trematodos ha experimentado variaciones para mejorar las posibilidades de su utilización, desde el punto de vista de realización/coste, así como la fiabilidad de los resultados obtenidos (BURGUEÑO y cols., 1995). La detección de anticuerpos frente a trematodos se correlaciona directamente con la exposición previa de los animales, lo que limita su utilidad (SÁNCHEZ-ANDRADE y cols., 2002). Puesto que los valores de absorbancia se comportan como una variable continua, el establecimiento del punto de corte resulta esencial para discernir si un resultado es positivo o no.

Se ha considerado la idoneidad de purificar antígenos para incrementar la sensibilidad y especificidad del ELISA (FRANCISCO, 2008; FRANCISCO, 2013). Con el desarrollo de procedimientos de Biología Molecular, se ha conseguido combinar el ADN de agentes parasitarios con el material genético de virus, bacterias o levaduras, lo que supuso la base para expresar a gran escala antígenos unitarios y obviar la recogida de formas parasitarias en mataderos (SPITHILL y DALTON, 1988).

El control parasitario basado en la determinación de forma individual de animales infectados no resulta práctico para los ganaderos ya que salvo en explotaciones de leche, en las que el tratamiento se administra durante la fase de secado, con frecuencia se aplican medidas de control integrado orientadas a un número variable de animales (BENNEMA y cols., 2009). Por ello, parece más realista adoptar medidas que incluyen el tratamiento de los bovinos y el cercado de áreas de riesgo en las parcelas cuando se dispone de un historial de niveles elevados de infección, y, sin embargo, en áreas de bajo riesgo, el diagnóstico y tratamiento sólo resultaría necesario si el rebaño tiene en su historial haber sufrido la parasitación y se detectan de nuevo animales con síntomas de trematodosis, o cuando aparecen caracoles que actúan como hospedadores intermediarios en los pastos que utilizan los bovinos.

Para BENNEMA y cols. (2011), no resulta prioritario distinguir los rebaños infectados de los que no lo están y sería más aconsejable detectar rebaños en los que la infección está ligada a pérdidas económicamente importantes. Con este fin habría que determinar un valor de absorbancia, *punto de corte*, que al correlacionarlo con otras variables como, tiempo atmosférico, tipo de pasto y la gestión de la explotación, permitiría conocer si el rebaño puede sufrir pérdidas de producción causadas por los trematodos. Recientemente, se ha señalado la utilidad de establecer un porcentaje de reducción de los valores de densidades ópticas tras la administración de un tratamiento antiparasitario, que permitiese establecer la eficacia de la terapia administrada, y que obviamente no alcanzaría el 100% como sucede con las pruebas copromicroscópicas (FRANCISCO, 2013; OLIVER, 2014; RODRÍGUEZ, 2014).

1.7.- CONTROL DE TREMATODOSIS BOVINAS

1.7.1. Sobre el medio

Resulta prioritario conocer los lugares en los que se desarrolla la fase externa del ciclo biológico de los trematodos, *Fasciola* y *Paramphistomum*, para evitar que los bovinos entren en contacto con las metacercarias. Una vez delimitados, para impedir que los animales accedan a estas zonas, la medida más adecuada es la instalación de vallas. A pesar de su reconocida utilidad, no se implementa con frecuencia, siendo económicas las razones más argüidas. En realidad, el vallado de áreas de riesgo no conlleva un desembolso excesivo, y hoy en día sería relativamente fácil mediante el empleo de pastores eléctricos que se alimentan a través de células fotoeléctricas.

Al mismo tiempo, se aconseja destruir el hábitat que propicia la supervivencia de los hospedadores intermediarios en los pastos mediante sistemas de drenaje, pero al igual que en el caso anterior, el coste de esta medida hace que no se aplique de forma rutinaria. Resulta asimismo adecuada la instalación de bebederos que no estén en contacto con el suelo y el aprovisionamiento de agua de bebida potable.

Distintos estudios plantean que el control resultaría eficaz destruyendo **los hospedadores intermediarios** y los **diferentes estadios de los trematodos en el medio** (miracidios, cercarias y metacercarias) (DE CARVALHO y cols., 1998; RUG y RUPPEI, 2000; NAPLES y cols., 2005; IANNACONE y cols., 2008).

Hasta hace unas décadas, uno de los procedimientos más utilizados para la destrucción de los caracoles era el empleo de cal viva (cianamida cálcica) sobre los prados en los que se sospechaba o tenía la certeza que los bovinos adquirirían la infección. Esta medida proporcionó excelentes resultados porque al efecto molusquicida, se añadía el beneficio de la corrección del pH de los suelos ácidos. Sin embargo dejó de aplicarse porque conlleva la destrucción indiscriminada de todos los caracoles e insectos.

Ante esta situación, se consideró la posibilidad de emplear productos naturales que tuvieran acción molusquicida, en especial se optó por ciertos extractos vegetales. Se ha demostrado la utilidad de los extractos de *Carica papaya* y *Areca catechu*, ya que además las concentraciones que provocan la eliminación de los caracoles no son tóxicas para peces, como *Colisa fasciatus*, que comparte el mismo hábitat con el caracol *Limnaea acuminata* (JAISWAL y SINGH, 2009).

En Cuba se comprobó *in vitro* que el extracto de *Momordica charantia*, conocida vulgarmente como melón amargo o cundiamor tiene efectos letales sobre *Fossaria cubensis*, hospedador intermediario de *Fasciola*, señalándose la necesidad de extender y profundizar este estudio en condiciones naturales, para conocer el impacto ecológico que produciría el extracto vegetal (DIÉGUEZ y cols., 2013).

A pesar de que se han conseguido identificar numerosos extractos de plantas con propiedades molusquicidas, y de que se ha demostrado que no resultan perjudiciales para otros organismos, es necesario reducir los volúmenes de los productos a utilizar, y también asegurar que estas sustancias sólo entren en contacto con los caracoles. Para lograr estos objetivos, se ideó una formulación que consiste en un cebo en forma de pellet, que contiene un atrayente y un molusquicida (HANIF y cols., 2013). En concreto, se prepararon gránulos de cebo obtenidos a partir de la morera (*Morus nigra*) (apigenina, quercetina y morusina), que además de resultar apetecibles para los caracoles también actúan como molusquicidas. De este modo se logró la destrucción del 72-89% de caracoles *Lymnaea acuminata*, hospedador intermediario de *Fasciola gigantica*.

Para destruir las fases del parásito que se encuentran en el ambiente, se han descrito extractos vegetales con propiedades ovicidas (DE CARVALHO y cols., 1998), miracidicidas (VINAUD y cols., 2005) y cercaricidas (NAPLES y cols., 2005).

Recientemente se ha comprobado que las esporas de algunos hongos del suelo destruyen los huevos de trematodos como *F. hepatica* o *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomum) (DIAS y cols., 2012; PIÑEIRO y cols., 2012).

Para el control de las infecciones parasitarias es importante un adecuado manejo de los pastos. Mientras que el pastoreo continuo, ofrece todas las posibilidades para que los ciclos de los parásitos se perpetúen, si se utilizan sistemas de pastoreo rotativo teniendo en cuenta la epidemiología de la zona, se favorece el control parasitario por dos mecanismos, el tiempo de permanencia en el pasto o el tiempo de descanso del mismo. Posiblemente, el pastoreo nómada, es el sistema de control parasitario más antiguo. Actualmente los más utilizados son:

En grupo (*mob grazing*): todos los animales se manejan como un sólo grupo que se mantiene en el pasto durante periodos de tiempo cortos.

Alternado (*alternated grazing*), consiste en alternar distintas especies (bovino y ovino). Una especie animal se alimenta en un grupo de pastos durante un periodo de tiempo, y después otra especie lo aprovecha durante un periodo de tiempo mayor.

Con cabeza y cola, o de líderes y seguidores (*leader/follower grazing*): Los animales con mayor requerimiento de nutrientes aprovechan el prado en primer lugar, y los que tienen menor necesidad pastan inmediatamente después.

Las estrategias rotacionales están evaluadas fundamentalmente para el control parasitario de nematodos gastrointestinales. Se recomienda el sistema de *líderes y seguidores* con ovejas y bovinos, en base a que algunas especies de parásitos son específicas de ovinos (*Cooperia*, *Ostertagia*), por lo que si los vacunos son los seguidores, actuarían como *limpiadores* ingiriendo las larvas del pasto (que no les afectarían), y de esta forma evitarían que pudiesen infectar a las ovejas.

También con el propósito de controlar las gastroenteritis parasitarias, se ha indicado el **sistema de dosificación y traslado (*dose and move*)** (MICHEL, 1969, 1976). Esta estrategia consiste en desparasitar a todos los individuos de un rebaño y seguidamente trasladarlos a una zona de pasto *segura*, con un nivel muy reducido de riesgo de infección (NANSEN y cols., 1989). No parece muy claro el beneficio de este procedimiento para el control de trematodosis como la fasciolosis (BENNEMA y cols., 2014). En Uruguay, país de clima templado y sistemas de producción mixtos, está demostrado el beneficio de contar con pastos seguros para ovinos (bajo nivel de contaminación/infección), mediante el pastoreo alternado previo con bovinos y el pastoreo rotacional (NARI y CARDOZO, 1987; CASTELLS y NARI, 1996).

1.7.2. Sobre los hospedadores definitivos

Pese a las evidencias de que el control efectivo de helmintos precisa de la combinación de manejo del pastoreo, conocimiento de la situación epidemiológica y del tratamiento de los animales (WALLER, 2006), prácticamente sigue sustentándose únicamente en el uso de antihelmínticos que garanticen la salud y productividad (STEAR y cols., 2007).

En el caso de los trematodos, el conocimiento preciso de la fase externa del ciclo biológico no impide que prácticamente la única medida de control (o al menos la más extendida) siga consistiendo en la aplicación de antiparasitarios sobre los hospedadores adultos.

Se dispone de un número importante de antiparasitarios, en especial fasciolicidas, que se administran de forma mayoritaria por vía oral (Tabla 2). Una encuesta recientemente desarrollada entre agricultores irlandeses sirve de ejemplo de lo que está sucediendo en los últimos en la mayoría de los países europeos y americanos. En base a este estudio, cuando se administran fasciolicidas, en la mayoría de los

casos (95%) se aplica un sólo un tratamiento al inicio del período seco, sin tener en cuenta la eficacia del producto utilizado (formas recién desenquistadas / inmaduras / adultas). Una tercera parte de los ganaderos utilizan Triclabendazol, el único ingrediente activo eficaz contra estadios precoces y adultos de *F. hepatica* (FAIRWEATHER y BORAY, 1999).

Tabla 2.- Antiparasitarios de acción trematocida.

Principio activo	Nombre comercial	Diana	Estadio
BENCIMIDAZOLES			
Triclabendazol	Fasinex (100 g) Tribex (100 g)	<i>Fasciola</i>	Inmaduros + Adultos
Albendazol	Albendaziven (100 g) Oversol (100 g) Valbazen (100 g) Zoodalben (100 g)	<i>Fasciola</i>	Adultos
SALICILANILIDAS			
Closantel	Closan-Jet (150 g) Endoex (50 g) Flukiver (50 g)	<i>Fasciola</i> <i>Paramphistomum</i>	Adultos
Oxiclozanida	Oxyzan (34 g)	<i>Fasciola</i> <i>Paramphistomum</i>	Adultos

Hay que tener en cuenta que trematocidas como Oxiclozanida o Albendazol presentan eficacia elevada frente a fasciolas adultas y menor frente a las juveniles, por lo que se recomienda administrar 2 tomas.

En algunos países se ha prohibido el uso de Rafoxanida, Closantel, Nitroxynil y Clorsulon debido a la ausencia de valores para el límite máximo de residuo en leche (O'BRIEN y cols., 2010). Esta medida beneficiosa para la salud humana, ha supuesto el incremento en la aplicación de Oxiclozanida y Albendazol, que en un futuro no lejano posiblemente provocará la aparición de cepas resistentes a estos antihelmínticos (CHARLIER y cols., 2009).

Entre los planes de la Unión Europea figura una estrategia para reducir el número de antiparasitarios disponibles, por lo que la situación descrita podría llegar a agravarse. Antes de implementar este tipo de medidas, deberían realizar un análisis del riesgo de los cambios de licencia. También se debería hacer hincapié en la necesidad de controles periódicos de los patrones de uso antihelmíntico, y utilizar materiales educativos específicos para veterinarios y ganaderos que promuevan el uso eficiente y sostenible de quimioprofilaxis (COOPER y cols., 2013).

Ciertos trematocidas son eficaces frente a fasciolas inmaduras y adultas, y otros contra *Fasciola* y *Paramphistomum*. La vía de administración oral no resulta de fácil aplicación en el caso de vacunos en extensivo, o dedicados a la producción de carne.

También es preciso tener en cuenta que los bovinos pueden sufrir poliparasitismos, no sólo por infecciones de helmintos sino también por ectoparásitos. Por este motivo, en los últimos años se ha llegado a la conclusión de la necesidad de combinar diferentes moléculas con acción frente a distintos parásitos (HUTCHINSON y cols., 2009; MARTÍNEZ-VALLADARES y cols., 2010). Estos productos generalmente se administran por vía parenteral o tópica, aunque existen algunas preparaciones orales (Tabla 3). El objetivo es conseguir un efecto antiparasitario más amplio y que la desparasitación resulte más sencilla, facilitando los quehaceres de los ganaderos. Es interesante destacar que todas estas combinaciones se aconsejan para el tratamiento frente a *Fasciola* y nematodos gastrointestinales, y en algunos casos de ectoparasitosis, pero no se hace referencia a la actividad frente a trematodos gástricos. Resulta notable que todas las sinergias de antiparasitarios ofrecen un efecto fasciolicida localizado en las formas inmaduras o juveniles y adultas del trematodo.

Tabla 3.- Formulaciones más novedosas de antiparasitarios de acción trematocida.			
Principio activo	Nombre comercial	Formulación	Supresión
Closantel (200 g) + IVM (5 g)	Closamectin	<i>Inyectable</i>	N L / 28 C
Clorsulon (100 g) + IVM (10g)	Ivomec Plus Virbamec Plus	<i>Inyectable</i>	N L / 49 C 14 L / 28 C / 42 E
Nitroxynil (340 g) + Clorsulon (67 g) + IVM (6,7 g)	Nitromec	<i>Inyectable</i>	N L / 56 C / 120 E
Triclabendazol (200 g) + Abamectina (5 g)	Genesis Ultra Avomec Plus	<i>Pour on</i>	91 L / 91 / C N L / 49 C / 140 E
Triclabendazol (200 g) + MOX (5 g)	Cydectin Plus Fluke Cydectin TriclaMox	<i>Pour on</i>	84 L / 84 C N L / 143 C
Triclabendazol (300 g) + IVM (5 g)	Fasimec Pour On	<i>Pour on</i>	N L / 49 C / 140 E

Triclabendazol (240 g) + IVM (1,5 g) + Dietilelinglicol monobutil éter	Sovereign	<i>Pour on</i>	N L / 28 C / 70 E
Triclabendazol (120 g) + IVM (2g)	Fasimec Oral	<i>Oral</i>	28 L / 21 C / 56 E
Las cantidades se refieren a un volumen de 1 L. N.L.: no administrar en vacuno de leche L: período de supresión (días) en vacuno de leche; C: en bovino de carne; E: exportación			

A pesar de todas las innovaciones descritas, y aunque se dispone de una amplia gama de antihelmínticos, el control óptimo de las infecciones parasitarias sigue siendo un reto (BLOEMHOFF y cols., 2014).

La creciente demanda de alimentos sanos, obtenidos de forma sostenible, ha impulsado la investigación de productos naturales, como los extractos de algunas especies vegetales. En experiencias de laboratorio, llevadas a cabo en México, se analizó el efecto de los extractos de 20 plantas sobre metacercarias recién desenquistadas (VERA-MONTENEGRO y cols., 2009). Los resultados indicaron una eficacia del 100% con *Tilia mexicana*, *Coffea arabica* y *Ternstroemia pringlei*, y del 95-100% con *Eriobotrya japonica* y *Crataegus mexicana*.

En otra investigación realizada en el mismo país, se recogieron 20 plantas que se procesaron para obtener sus extractos en hexano, acetato de etilo y metanol. Los mejores resultados frente a fasciolas adultas (80-100% de eliminación) se obtuvieron con *Castela tortuosa* (chaparro amargo), *Achillea millefolium* (Plumajillo), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Justicia spicigera* (muicle), *Limpia citridora* (cedrón), *Populus alba* (Alamo), *Mentha piperita* (menta), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo), *Lippia graveolens* (orégano), *Artemisia mexicana* (estafiate) y *Artemisia absinthium* (ajenjo) (IBARRA-MORENO y cols., 2012).

Investigaciones recientes han demostrado que la suplementación de la dieta con vitamina E provoca la reducción de la carga parasitaria en ovinos infectados de forma experimental (MARTÍNEZ-PÉREZ y cols., 2014).

1.7.3. Control de trematodosis en el Uruguay

La mayoría de los ganaderos no solicitan pruebas para el diagnóstico de *Fasciola*. Esta situación mejora un poco si se trata de potreros (destinados al cebo de animales) o en el caso de que en la explotación los lanares convivan con vacunos.

Tampoco usan ningún sistema para evitar que los animales tengan acceso a las zonas encharcadas; pese a que disponen de pastores eléctricos con batería y solares, que utilizan para dividir parcelas de alimentación diaria o semanal. Por otra parte, en ocasiones la única fuente de agua de que disponen los animales en pastoreo son las cañadas o humedales por lo que no resulta adecuado evitar el acceso de los vacunos a estas zonas.

El procedimiento más extendido para el control de la fasciolosis en ganado de cebo consiste en la administración de antiparasitarios de forma *estratégica*, un tratamiento a la entrada de la primavera y otro en el otoño. El ganado de leche se desparasita sólo en el período de secado. Cuando hay problemas de fasciolosis en lanares o en potreros, los animales reciben más tratamientos al año (3 ó 4 veces), sin base diagnóstica.

Prácticamente no se considera el tratamiento frente a la parafistomosis, y los trematocidas más empleados son:

Triclabendazol (25%): oral o inyectable (desde hace 2 años)

Closantel (10%): oral o inyectable

Nitroxinil (34%): inyectable

Clorsulon (10%): inyectable, en asociación con ivermectina

1.7.4. Control práctico de la fasciolosis

La erradicación de *F. hepatica* resulta muy difícil y su control se debería orientar hacia la reducción de la intensidad de la infección y la disminución del porcentaje de bovinos parasitados de manera que no interfieran con la productividad del rebaño (VERCRUYSSSE y CLAEREBOUT, 2001). Estos mismos autores han sugerido que la infección individual por al menos 30 fasciolas, junto con prevalencias de rebaño superiores al 25%, son puntos de corte para establecer que la infección por *Fasciola* afecta a la productividad de los animales. Sin embargo, observaron fibrosis hepática y aumentos pronunciados en los niveles de γ -GT-niveles en bovinos con sólo 10 trematodos, que podrían traducirse en mermas en la productividad.

Resultaría de gran ayuda poder disponer de pruebas que hagan posible medir la influencia de la parasitación sobre el rendimiento económico. En general, no existe correlación entre el recuento fecal de huevos y la carga parasitaria (ABDEL-RAHMAN y cols., 1998; PHIRI y cols., 2006), por lo que la intensidad de la infección no se puede establecer antes del sacrificio de los animales.

La determinación de niveles de anticuerpos específicos en tanque de leche podría constituir un método asequible y eficaz para monitorizar el estado parasitario de un rebaño en relación con la fasciolosis, como ya se ha demostrado para las gastroenteritis parasitarias (SÁNCHEZ y DOHOO, 2002; CHARLIER y cols., 2007). Además, se ha demostrado una correlación positiva entre los valores de anticuerpos específicos frente a *Fasciola* en tanque de leche y la seroprevalencia del rebaño (SALIMI-BEJESTANI y cols., 2005).

Se ha comprobado que existe correlación entre un aumento en las densidades ópticas frente a *Fasciola* (ODRf) en muestras de tanque desde el primer cuartil (0,428) hasta el tercer cuartil (1,064), y una disminución media en la producción de leche de 0,7 Kg / día / vaca, y del promedio de materia grasa láctea en un 0,06%. Al mismo tiempo, se observó que el intervalo entre partos se incrementaba en 4,7 días (CHARLIER y cols., 2007).

2. Objetivos

Al tener en cuenta los antecedentes expuestos, consideramos necesario desarrollar estudios para adquirir un conocimiento preciso y actual de la distribución de estos parasitismos entre el ganado vacuno del Uruguay.

En este trabajo nos hemos propuesto los siguientes **OBJETIVOS**:

- 1.- Establecer las trematodosis parasitarias que afectan al ganado vacuno del Uruguay.**
- 2.- Determinar la prevalencia de infección por trematodos parásitos en el ganado vacuno del Uruguay y analizar la influencia de algunos factores intrínsecos (raza, edad, sexo) y extrínsecos (aptitud).**
- 3.- Analizar la utilidad de la aplicación de técnicas inmunoenzimáticas para el estudio de las trematodosis del ganado vacuno.**
- 4.- Estudiar la eficacia de fasciolicidas frente a parafistomos.**

3. Unidad temática

Las trematodosis son infecciones parasitarias de interés en las explotaciones de ganado vacuno debido a que las lesiones que provocan reducen el estado de salud de los animales y merman su productividad. La más conocida es la fasciolosis (*Fasciola hepatica*), por su repercusión económica; sin embargo, no se dedica la atención adecuada a la paranfistomosis (*Paramphistomum* spp.), obviándose en la mayoría de los casos que en su ciclo biológico también desarrolla una fase externa que es idéntica a la de *Fasciola*, e incluso que ambos parásitos pueden llegar a coexistir. Debido a que el diagnóstico rutinario en ambos casos consiste en la observación de huevos en las heces de los bovinos, y puesto que existe una notable similitud entre los de *Fasciola* y *Paramphistomum*, en numerosas regiones se ha llegado a sobre-estimar la importancia de la fasciolosis, que ha provocado la aplicación de tratamientos fasciolocidas, en su mayoría ineficaces frente a los paranfistomos.

En áreas con climas mesotermales como el Uruguay, el forraje crece durante la mayor parte del año, lo que permite la explotación del ganado en extensivo. A pesar de las indudables ventajas frente a la ganadería intensiva en cuanto al manejo de los animales (menos mano de obra, mecanización de labores agrícolas y mejora el bienestar animal) y su productividad (alimentos de mayor calidad), el mantenimiento de ganado en extensivo puede aumentar su exposición a algunos agentes patógenos como los trematodos.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de las trematodosis que afectan al ganado vacuno en el Departamento de Salto (Uruguay), se desarrolló un estudio que se articuló en 4 apartados. El planteamiento del **primer ensayo** consistió en determinar los factores que entrañan un riesgo para la infección por *Fasciola* en bovinos de esta región. Teniendo en cuenta que los rumiantes se manejan en rebaños, se decidió aplicar una prueba inmunoenzimática con antígenos de excreción/secreción de *F. hepática*, puesto que la obtención de muestras de suero resulta más sencilla que la de heces, así como su procesamiento en el laboratorio. Los resultados obtenidos se estudiaron en función de factores intrínsecos (edad, raza, sexo) y extrínsecos (aptitud).

La alimentación de los animales ha experimentado diferentes tendencias en respuesta a los distintos requerimientos energéticos del tipo de producción y al precio de algunas materias primas. En las últimas décadas, el incremento del coste de los cereales, junto con la oportunidad de producir alimentos con determinadas características organolépticas cada vez más demandadas por los consumidores, ha impulsado el manejo en extensivo de un mayor número de cabezas en diferentes

países. Para la realización del **segundo ensayo**, se consideró la posibilidad de que el doctorando desarrollase una estancia de investigación en la Facultad de Medicina Veterinaria de Lisboa, y tuviese la ocasión de analizar muestras de sueros de ganado vacuno de Portugal. Es interesante destacar que con este **ensayo** se trató de aportar información actualizada sobre la fasciolosis bovina en este país, y además comparar los resultados con los obtenidos en el Uruguay. En este caso, se tomaron muestras de sangre de bovinos de dos zonas climáticas diferentes, Uruguay (clima subtropical húmedo) y Portugal (clima mediterráneo), que se analizaron con un ELISA y un antígeno recombinante de superficie de *F. hepatica* (FhrAPS). Los resultados se analizaron de acuerdo a la raza, edad, sexo y aptitud. A diferencia del primer ensayo, se optó por el empleo de un antígeno unitario, la proteína recombinante FhrAPS, dado que de este modo es posible comparar los resultados obtenidos, soslayándose las posibles diferencias que podrían surgir si se emplean antígenos crudos obtenidos a partir de fasciolas de diferentes zonas geográficas.

Se mencionó previamente el desconocimiento de la parafistomosis bovina en el Uruguay, aspecto que se trató de solucionar con el **tercer ensayo**, en el que se diseñó una estrategia que consistió en comparar qué factores guardan relación con la presencia de parafistomosis en vacunos de Galicia (NO España), región en la que existe un conocimiento notable sobre esta trematodosis gástrica, y en bovinos de Salto (Uruguay). Se recogieron muestras de heces y de sangre, que se analizaron mediante la técnica copromicroscópica de sedimentación, y un ELISA con antígenos de excreción/secreción de adultos de *Calicophoron daubneyi*, respectivamente.

Finalmente, con el **cuarto ensayo** se pretendió ofrecer una solución para el control de las trematodosis (fasciolosis y parafistomosis) que afectan al ganado vacuno en el Uruguay. Para ello, se evaluaron 4 fármacos antiparasitarios con actividad fasciolicida reconocida, que se emplearon para el tratamiento de ganado vacuno con parafistomosis. La valoración de la eficacia de los antihelmínticos se midió con la prueba de sedimentación, puesto que está unánimemente reconocida a tal efecto, pese a los inconvenientes que entraña.

La actividad investigadora desarrollada se presenta en esta Memoria bajo el formato de **compendio de publicaciones**. En la elección de las revistas se tuvo en cuenta su difusión e importancia, por lo que 2 de los artículos aquí recogidos se publicaron en *Veterinary Parasitology* (JCI IF= 2,545; 4/15). Sin embargo,

teniendo en cuenta que el idioma (inglés) en el que se edita esta revista, su acceso restringido a bibliotecas especializadas, y el posible ámbito de aplicación de los resultados obtenidos, los otros 2 artículos se publicaron en las 2 revistas más importantes en lengua castellana, *Archivos de Medicina Veterinaria* (JCI IF= 0,545; 4/15) y *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología* (no indexada), que se pueden consultar de forma libre en internet.

4. Publicaciones

SANCHÍS J., MIGUÉLEZ S., SOLARI M.A., PIÑEIRO P., MACCHI M.I., MALDINI G., VENZAL J., MORRONDO P., DÍEZ-BAÑOS P., SÁNCHEZ-ANDRADE R., PAZ-SILVA A. y ARIAS M.S. (2011). **Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay)**. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 70: 163-171.

<http://www.rilparasitologia.org/index/file/id/6>



J. SANCHÍS, G.V. HILLYER, L.M. MADEIRA DE CARVALHO, M.I. MACCHI, C. GOMES, G. MALDINI, G. STILWELL, J.M. VENZAL, A. PAZ-SILVA, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, M.S. ARIAS. (2014). **Fasciolosis en ganado vacuno en extensivo de Uruguay y Portugal**. Arch Med Vet. 191: 165 - 171.



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Veterinarias

Archivos de Medicina Veterinaria

Valdivia, 26 de agosto 2014
N° 122-2014

Señorita
Dra. María Sol Arias
Facultad de Veterinaria
Universidad Santiago de Compostela
Lugo
ESPAÑA

Estimada Dra. Arias,

El Comité Editor de la revista Archivos de Medicina Veterinaria tiene el agrado de comunicar a Ud. que su trabajo titulado "**Riesgo de exposición a *Fasciola hepatica* en ganado vacuno en extensivo de Uruguay y Portugal determinado mediante ELISA y un antígeno recombinante**", ha sido aceptado para su publicación en la modalidad de **Artículo Original** en el **Vol. 47 año 2015**.

Quisiéramos además recordarle que para hacer efectiva la publicación de su artículo, debe Ud. cancelar la suma de US \$350 antes del 30 de noviembre 2014. Este pago puede ser efectuado con tarjeta de crédito en la opción *pago online* que aparece en nuestro sitio web, en la siguiente dirección: http://www.veterinaria.uach.cl/archivos_med_vet/pago.php, o bien usted puede hacer una transferencia bancaria con los siguientes datos y luego enviarnos una copia del comprobante de depósito por email:

Banco Corresponsal: PNBPU3NNYC (Wachovia Bank N.A. New York)

ABA: 026005092

Beneficiario: Universidad Austral de Chile

Banco: Banco Santander Chile, cta. corriente n° 00510004997-1, Código SWIFT = BSCHCLRM

Dirección: Pérez Rosales 585 Valdivia, Chile

Saluda atentamente a Ud.

Enrique Paredes H.
Presidente Comité Editor
Archivos de Medicina Veterinaria

P.S. El Comité Editor verá con mucho agrado, hacer referencia a citas de trabajos publicados durante 2013 y 2014 en Archivos de Medicina Veterinaria para publicaciones futuras.

Fasciolosis en ganado vacuno en extensivo de Uruguay y Portugal

Prevalence of fasciolosis in cattle under extensive management from Uruguay and Portugal

J Sanchís^{ab}, GV. Hillyer^c, LM. Madeira de Carvalho^d, MI Macchi^b, C Gomes^d, G Maldini^b, G Stilwell^d, JM Venzal^b, A Paz-Silva^a, R Sánchez-Andrade^a, MS Arias^{a*}

^aDepartamento Patología Animal, Epidemiología, Zoonosis y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo (España).

^bParasitología, Universidad de la República (Regional Norte), Salto (Uruguay).

^cLaboratorio de Inmunología Parasitaria y Patología, 617-A, Escuela de Medicina, Campus de Ciencias Médicas, Universidad de Puerto Rico, San Juan (Puerto Rico) 00936-5067.

^dCIISA, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Lisboa, Av. da Universidade Técnica de Lisboa, 1300-477 Lisboa (Portugal).

*Fax: 982822001. Correo electrónico: mariasol.arias@usc.es. Facultad de Veterinaria de Lugo, Departamento de Sanidad Animal, Pabellón 1, Planta Baja, Avda. Carvallo Calero, s/n, 27002 Lugo, España.

SUMMARY

The risk of exposure to *Fasciola hepatica* in cattle maintained under extensive conditions from two different climatic areas was evaluated. Bovine serum samples collected in Uruguay (humid subtropical climate; 1,192 samples) and Portugal (mediterranean climate; 473 samples) were tested against a *F. hepatica* recombinant surface antigen (FhrAPS) by means of an ELISA. Data obtained was analyzed according to the bovine breed, age and aptitude.

An overall percentage of 56% (95% CI, 53-59) cattle were positive to the FhrAPS-ELISA in Uruguay, with significantly highest percentages in 2-4 year Holstein dairy cows. In Portugal, the percentage of sensitization was 47% (95% CI, 43-52) with the highest values recorded among Crossbreeds and beef bovines between 2-4 years of age. By means of the FhrAPS-ELISA, it was concluded the risk of exposure to *F. hepatica* among extensively reared cattle is higher in areas under humid subtropical climate than in those with Mediterranean climate. The observation of elevated possibilities of calves are exposed to the liver trematode without dependence of the climate conditions emphasizes the need for preventive measures against infective stages in the environment together with successful deworming programs.

Key words: cattle fasciolosis, grazing, risk assessment, immunoassay.

INTRODUCCIÓN

En las regiones de la mayoría de los continentes, donde los climas son mesotermiales (con una temperatura media superior a 10°C en los meses más cálidos), el forraje verde crece durante la mayor parte del año, lo que permite la explotación del ganado en extensivo.

Este tipo de manejo proporciona ventajas frente a la ganadería intensiva, fundamentalmente menos mano de obra, mecanización de labores agrícolas y mejora el bienestar animal. El ganado mantenido en pastoreo proporciona alimentos de mejor calidad, como carne que se considera natural certificada (con pasto y libre de hormonas) o carne etiquetada con certificación de alimento orgánico.

Entre los climas mesotermiales, el húmedo subtropical se caracteriza por veranos calurosos y húmedos e inviernos suaves (Kottek y col 2006). Las precipitaciones son constantes a lo largo del año, por lo que no existe un periodo seco. Estas condiciones favorecen la cría del ganado en condiciones naturales (Carámbula 1996). Este tipo de clima sucede en el lado sureste de todos los continentes, por lo general entre las latitudes 25° y 40° norte, comprendiendo áreas del sureste de Asia, África, Medio Oriente, América del Norte y del Sur, y este de Australia.

El clima mediterráneo (también clasificado como mesotermal) se define por veranos calurosos y secos e inviernos lluviosos y fríos, momentos en los que se reduce el crecimiento del forraje. Las condiciones climáticas adversas y la escasez de pasto en invierno obligan a la estabulación del ganado, época en la que se alimenta con forraje seco o ensilado y concentrado (pienso). Este clima por lo general se da en los lados occidentales de los continentes, entre las latitudes de 30° y 45°, por lo que se puede encontrar en el sur de Europa, California, Suroeste de Sudáfrica, Australia Occidental y del Sur.

La cría de ganado en extensivo puede aumentar su exposición a algunos agentes patógenos como *Fasciola hepatica*, responsable de importantes pérdidas económicas por anemia, disminución de la producción de leche y decomiso del hígado (Reid y Dargie 1995). Se han detectado reducciones en la ganancia de peso vivo de terneros entre 0,07 y 1,2 kg / semana (reducción total del 4,1 al 28%) (Marley y col 1996; Schweizer y col 2005; Sariözkan y Yalçın 2011). Las novillas con fasciolosis requieren más inseminaciones que las no infectadas (Hope Cawdery 1984).

Los animales parasitados por *F. hepatica* eliminan huevos en las heces, cuando caen en zonas encharcadas si la temperatura es superior a 10°C, en pocos días albergan en su interior un embrión llamado miracidio, capaz de infectar a los hospedadores intermediarios, caracoles anfibios limneidos (Bennema y col 2011). Después de completar varias fases, se forman las cercarias, que abandonan los caracoles y se transforman en metacercarias en el ambiente (fase infectiva). De esta manera, el riesgo de exposición al trematodo hepático guarda relación directa con las condiciones climáticas que determinan la supervivencia de los caracoles y metacercarias en el medio ambiente (Dunkel y col 1996).

Se han desarrollado diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico de la fasciolosis bovina (Cornelissen y col 2001, Rapsch y col 2006, Salimi-Bejestani y col 2008, Mezo y col 2011, Sen y col 2011). Los ensayos inmunoenzimáticos permiten evaluar la exposición de los animales al trematodo (Sánchez-Andrade y col 2000,

Arias y col 2010), lo que resulta útil para obtener información sobre la distribución de la infección, las zonas de riesgo y otros posibles factores implicados (Kuerpick y col 2010).

Con objeto de determinar si el clima influye en la posibilidad de exposición a *F. hepatica* del ganado vacuno en extensivo, en la presente investigación se obtuvieron sueros de bovinos de dos países con diferentes características climáticas, Uruguay (clima subtropical húmedo) y Portugal (clima mediterráneo). La presencia de anticuerpos IgG frente al trematodo se evaluó mediante un antígeno recombinante de superficie de *F. hepatica* de 2,9 kDa (FhrAPS).

MATERIAL Y MÉTODOS

Áreas de estudio

Entre agosto y diciembre de 2011, se recogieron muestras de sangre de 1.192 bovinos pertenecientes a 40 fincas en Uruguay (33° 00' 00" S, 56° 00' 00" W). Por su situación en la zona templada del hemisferio sur tiene un clima moderado, con valores máximos de temperatura en enero y mínimos en julio, y una pequeña variación térmica anual (alrededor de 8°C) (Fox y col 2011, Eleftheratos y col 2011). Las precipitaciones son abundantes y regulares en cualquier época del año (332 mm en primavera, 360 en verano, 407,8 en otoño y 277,9 en invierno).

Desde marzo de 2011 a febrero de 2012 se tomaron muestras de sangre de un total de 473 bovinos en 17 granjas de Portugal (39 ° 30' 00" N, 8° 00' 00" W). El clima se caracteriza por tener veranos calurosos y secos e inviernos fríos y lluviosos, en las zonas costeras las temperaturas tanto en el verano como en el invierno son más suaves por la presencia cercana del mar (Kuchai y col 2011). La precipitación media anual es de 86,7 mm en primavera, 38,7 mm en verano, 163,5 mm en otoño y 129,3 mm en invierno.

Ganado vacuno

Uruguay

El censo bovino en Uruguay es de alrededor de 11.805.573 animales destinados a la producción de carne (94%) y de leche (5%). Las vacas de razas cárnicas (Hereford, Angus y cruces) se mantienen todo el año en pastizales naturales compuestos por una asociación de *Paspalum notatum* (pasto horqueta) y *Axonopus affinis* (pasto chato) que contribuye con más del 30% de la materia seca total. Otras especies presentes en orden decreciente son: ciperáceas, *Coelorhachis selloana* (cola de lagarto), *Paspalum dilatatum* (pasto miel), *Stenotaphrum secundatum* (gramillón), *Panicum milioides* (pasto tierno), *Cynodon dactylon* (gramilla), *Setaria geniculata* (pasto amargo) y *Axonopus argentinus* (pasto chato). El 77% de la producción de forraje se consigue a partir de 10 especies. Durante el invierno, los animales pueden pastorear raigrás (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*) y avena (*Avena sativa*). La rotación de los pastos está en función de la abundancia del forraje, y si es necesario los animales se suplementan con ensilado de sorgo (*Sorghum bicolor*) o concentrado. Disponen de agua procedente de pozos naturales, cañadas o arroyos.

Los bovinos de leche (Holstein), a diferencia del vacuno de carne, aprovechan praderas húmedas durante todo el año, en otoño, invierno y primavera pastan trébol (*Trifolium spp.*), Lotus (*Lotus corniculatus*), avena y raigrás, y en verano praderas de sorgo. En algunas praderas también se cultiva trigo (*Triticum aestivum*), festuca (*Festuca arundinacea*) y pasto ovilla (*Dactylis glomerata*). La alimentación del vacuno lechero se complementa con ensilado de sorgo o maíz (*Zea mays*). Las vacas Holstein se ordeñan 1-2 veces / día, momento en el que ingieren agua de bebederos con agua corriente.

El control de la fasciolosis consiste en la administración de nitroxinil, closantel o triclabendazol. El ganado de carne (novillas principalmente) recibe 2 dosis, al comienzo del otoño y en la primavera. Las vacas lecheras se desparasitan durante el período de secado.

Portugal

Existe un censo aproximado de 1.529.000 reses de vacuno en Portugal (INE 2012), de las que aproximadamente el 35% se mantiene en régimen extensivo (Limousine, cruces y Charolais) para cría o producción de carne. Se trata de rumiantes que se alimentan en pastizales naturales (compuestos por *Erica arborea*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense* y *Chamomilla recutita*) o cultivados (*Trifolium pratense*, *T. repens*, *Lolium multiflorum*). En todos los casos, cuando el forraje es escaso (diciembre a febrero), se les proporciona suplementación a base de concentrado (pienso).

Los animales sólo se estabulan si las condiciones climáticas son muy desfavorables.

El control parasitario consiste en la administración de antiparasitarios (albendazol, ivermectina más clorsulón, ivermectina más closantel o sólo closantel) 1 vez al año.

Las vacas de leche (Holstein) suelen permanecer estabuladas durante el período de ordeño, y sólo pastan en el período seco, por lo que no se tuvieron en cuenta en el estudio actual.

Muestreo

La toma de muestras de sangre se realizó con el apoyo de veterinarios clínicos que habitualmente colaboran con la Universidad de la República (Uruguay) y la Universidad Técnica de Lisboa (Portugal). Ninguno de los propietarios se negó a colaborar.

Teniendo en cuenta que en ambos países las vacas lecheras generalmente se sacrifican a los 7-9 años, sólo se incluyeron en el presente estudio bovinos menores de 9 años. En función de la edad, se establecieron 3 grupos: < 2 años, 2-4 años y > 4 años.

Protocolo FhrAPS-ELISA

La presencia de anticuerpos séricos frente al antígeno de superficie FhrAPS se evaluó en el Laboratorio de Enfermedades Parasitarias (Universidad de Santiago de Compostela, España) mediante un ELISA (Paz- Silva y col 2007), técnica que cuenta con una sensibilidad del 86% y especificidad del 88% (Arias y col 2010).

Los sueros utilizados como testigos negativos se obtuvieron de 42 terneros estabulados desde su nacimiento que nunca eliminaron huevos del trematodo en las heces. El punto de corte para un resultado positivo se tomó como la densidad óptica media (DO) de todos los sueros negativos más 3 veces la desviación estándar (Sánchez-Andrade y col 2002). Por lo tanto, las muestras se consideraron positivas cuando los valores de DO fueron $> 0,3887$.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como porcentajes de seroprevalencia verdadera (Greiner y Gardner 2000), el intervalo de confianza al 95%, y se analizaron mediante la prueba de χ^2 . Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

Las posibles relaciones entre la seroprevalencia, la raza, edad o sexo, como variables independientes (predictores) se estimó mediante el cálculo de la razón de posibilidades (OR, por sus siglas en inglés: odds ratio) de seropositividad (resultado) mediante regresión logística (Thrusfield 2005). Los análisis se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics (20.0.0).

Las normas éticas

Esta investigación fue sometida a revisión ética y fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de la República (Regional Norte), Salto (Uruguay) y de la Universidade Técnica de Lisboa (Portugal). En el manejo de los bovinos se respetaron las leyes de bienestar animal y las directrices de ambos países.

RESULTADOS

Seroprevalencia individual

La seroprevalencia de fasciolosis fue del 56% (IC 95 %, 53-59) en Uruguay y del 47% (43-52), en Portugal ($P = 0,001$).

En Uruguay se alcanzaron porcentajes significativamente más altos de positividad en las vacas de raza Holstein, y en Portugal en los Cruces (Cuadro 1). Con respecto a la edad, las mayores seroprevalencias se observaron en los animales de 2-4 años de ambos países (Uruguay: 64%, 60-68; Portugal: 61%, 51-70). El porcentaje de bovinos menores de 2 años que resultaron positivos al FhrAPS-ELISA fue del 51% (46-56) en Uruguay y del 43% (32-54) en Portugal ($P = 0,179$).

En cuanto a la aptitud, se demostraron seroprevalencias significativamente más elevadas en el ganado lechero en Uruguay, y en el de carne en Portugal.

El Cuadro 1 resume que no se observaron diferencias estadísticamente significativas según el sexo, aunque las vacas lograron valores de seropositividad más altos en Uruguay, y los toros en Portugal.

Análisis de riesgo

El valor más elevado de OR se obtuvo entre las vacas Holstein (aptitud lechera) y en los animales de 2-4 años de edad en Uruguay (Cuadro 1), y en los Cruces (carne) y en animales de 2-4 años de edad en Portugal.

Seroprevalencia en explotaciones

El 95% de las explotaciones del Uruguay y el 71% de las de Portugal tenían al menos un animal seropositivo. En Uruguay todas las granjas con mayoría de vacas Holstein o Hereford tenían algún animal seropositivo y en Portugal las granjas con vacuno resultado del cruce de diferentes razas alcanzaron los niveles más altos de seropositividad (Cuadro 2).

Según la edad de los bovinos, se observó la menor prevalencia de explotaciones positivas en aquellos con rumiantes menores de 2 años. No se demostraron diferencias significativas en cuanto a la edad, sexo ni aptitud (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó el riesgo de exposición al trematodo *F. hepatica* en ganado vacuno en régimen extensivo de dos países con diferente clima (subtropical húmedo y Mediterráneo). Mediante un ELISA con un antígeno recombinante de superficie de *F. hepatica* de 2,9 kDa (FhrAPS) (Paz-Silva y col 2005), se comprobó que casi todas las granjas de Uruguay tenían rumiantes seropositivos, con una prevalencia individual del 56%. En un estudio previo desarrollado con antígenos de excreción/secreción de trematodos adultos se demostró una seroprevalencia individual del 67% en la región de Salto (noroeste de Uruguay) (Sanchís y col 2011). Asimismo, entre los años 2007 y 2008, en los mataderos de Uruguay se decomisó el 37,4% de hígados de bovinos debido a las lesiones provocadas por *F. hepatica* (Castro y Brito 2008).

En Portugal se ha diagnosticado la fasciolosis bovina mediante el uso de pruebas coprológicas y en mataderos (Conceição y col 2002, Arias y col 2011). El presente trabajo mostró que el 71% de las granjas tenían bovinos con anticuerpos frente al trematodo hepático, con una exposición individual de los animales del 47%. Estos valores son similares a los señalados previamente en el centro-norte de Portugal (Conceição y col 2004), y más bajos que los encontrados en una región endémica fronteriza del noroeste de España (Arias y col 2010).

Las condiciones climáticas influyen en la actividad de los hospedadores intermediarios de *F. hepatica*, y como consecuencia en la transformación de cercaria a metacercaria (fase infectiva) (Fox y col 2011). En zonas con clima subtropical húmedo parecen concurrir condiciones que favorecen la presencia de caracoles limneidos todo el año (Nari y col 1986), por lo que la seroprevalencia más alta en Uruguay podría atribuirse a una mayor contaminación de los pastos con metacercarias de *F. hepatica*. Sin embargo, las bajas temperaturas que se registran durante el invierno en las zonas de clima mediterráneo inducen a los caracoles a enterrarse en el barro (OMS 1997), reduciéndose de este modo la emisión de cercarias al medio. Como consecuencia, la infección de los vacas dependerá sobre todo del final de la hibernación de los caracoles infectados, porque a pesar de la resistencia de las metacercarias al frío, menos del 30% metacercarias sobreviven viables en el pasto hasta la primavera en regiones con clima mediterráneo (Luzón-Peña y col 1995, Dunkel y col 1996).

La observación de las mayores seroprevalencias en los bovinos de 2-4 años de ambos países coincide con investigaciones previas en regiones endémicas, en las que utilizando un ELISA con antígeno recombinante (FhrAPS) se comprobó la exposición al trematodo hepático en más del 40% de los terneros (Sánchez-Andrade y col 2000, 2002).

Las condiciones climáticas afectan a la supervivencia y actividad de los hospedadores intermediarios de *F. hepatica* y a la viabilidad de las metacercarias, y condicionan el manejo del ganado, influyendo todos estos factores en el riesgo de exposición al trematodo. La observación de la mayor seroprevalencia en Uruguay entre las vacas Holstein confirma los resultados previamente obtenidos (Sanchís y col 2011b), en animales que se alimentan en pastizales húmedos durante todo el año, lo que sin duda favorece la ingestión de metacercarias. Otro aspecto a tener en cuenta es que el ganado Holstein en las granjas de Uruguay ingiere agua de bebederos próximos a las salas de ordeño, mientras que el resto de bovinos lo hace de pozos naturales. Debemos de considerar que la infección por *F. hepatica* puede producirse por la ingestión de hierba o agua contaminada (Marcos y col 2007). Recientemente se ha demostrado la presencia de metacercarias de *F. hepatica* en el agua suministrada a granjas de Colombia (Rodríguez y col 2012). Por el contrario, los bovinos Cruce de Uruguay pastan en praderas naturales que se secan durante el verano, lo que probablemente reduzca el riesgo de infección. Al contrario, en Portugal los Cruces alcanzaron las seroprevalencias más elevadas, en coincidencia con lo demostrado en un área próxima del noroeste de España (Sánchez-Andrade y col 2002), posiblemente porque en los pastos se mantienen humedales durante todo el año, y los animales destinados a la producción de carne rara vez se desparasitan (Arias y col 2010).

El control de la fasciolosis radica en protocolos de desparasitación. En la estimación de la prevalencia basada en la detección de anticuerpos debemos de tener en cuenta que los hospedadores son tratados con fármacos antiparasitarios. Aunque los valores de anticuerpos se redujeron significativamente en los rumiantes que reciben albendazol o netobimin, no se registraron valores correspondientes a animales no infectados (Arias y col 2009). En ambos países, el ganado vacuno recibe 2 dosis de tratamiento fasciolicida, en primavera y en otoño. En Uruguay, sólo los animales menores de 3 años reciben 2 dosis de nitroxinil por año. No se han observado diferencias en cuanto al sexo de los animales, pero en Uruguay los toros rara vez son desparasitados y las vacas Holstein sólo pueden ser tratadas durante el período de secado.

Los datos recogidos en el presente trabajo señalan que el ganado vacuno en extensivo tiene un riesgo importante de exposición a *F. hepatica*, especialmente en zonas con clima subtropical húmedo. La elevada seroprevalencia de los terneros, con independencia de las condiciones climáticas, indica que desde que comienzan el pastoreo los animales ingieren metacercarias, por lo que resulta necesario reducir la contaminación de los pastos por metacercarias de *F. hepatica*, dado que la desparasitación proporciona sólo una solución a corto plazo, y la construcción de cercas para evitar que el ganado acceda a las áreas húmedas es una opción rara vez contemplada. En los últimos años se han descrito algunos procedimientos prometedores de control biológico basados en la utilización de hongos saprófitos con actividad ovicida (Dias y col 2012; Arias y col 2013). Con la destrucción de los huevos de *F. hepatica*, se prevendría la infección de los caracoles limneidos y por lo tanto la

emisión de cercarias. Existen investigaciones en marcha para establecer la forma adecuada que permita añadir estos hongos a las heces de los animales en pastoreo.

RESUMEN

Para evaluar el riesgo de exposición a *Fasciola hepatica* del ganado vacuno en extensivo, se tomaron muestras de sangre de dos zonas climáticas diferentes, Uruguay (clima subtropical húmedo, 1.192 muestras) y Portugal (clima mediterráneo, 473 muestras), que se analizaron con un ELISA y un antígeno recombinante de superficie de *F. hepatica* (FhrAPS). Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo con la raza, edad sexo y aptitud.

La seroprevalencia global en Uruguay resultó del 56% (Intervalo de Confianza, IC 95%: 53-59) mediante FhrAPS-ELISA, con porcentajes significativamente más altos en vacas lecheras Holstein de 2-4 años. En Portugal, el porcentaje de sensibilización fue del 47% (IC 95%: 43-52) con los valores más elevados en bovinos resultado de cruces de distintas razas, destinados a la obtención de carne y con edad también comprendida entre 2-4 años. Se concluyó que el riesgo de exposición a *F. hepatica* del ganado vacuno en extensivo es mayor en las zonas con clima subtropical húmedo que en las de clima mediterráneo. Los terneros presentan un alto riesgo de exposición al trematodo hepático con independencia de las condiciones climáticas. Los resultados ponen de manifiesto la necesidad de adoptar medidas frente a las formas del parásito que se encuentran en el medio y combinarlas con programas de desparasitación eficaces.

Palabras clave: fasciolosis, pastoreo, riesgo de exposición, inmunoensayo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por los proyectos de investigación 10MDS261023PR (Xunta de Galicia, España), AGL2012-34355 (Ministerio de Economía y Competitividad, España, FEDER). La Dra. María Sol Arias recibió un contrato "Parga Pondal " (XUGA) MS Arias.

Jaime Sanchís recibió una beca de investigación (Edmundus 17, Banco de Santander-USC, España) para realizar su Tesis Doctoral en la Universidade de Santiago de Compostela (España). Algunos de los datos presentados han sido recogidos durante su estancia de investigación en el Centro de Investigación Interdisciplinaria en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria (CIISA-FVM-TUL).

REFERENCIAS

Arias MS, JL Suárez, GV Hillyer, I Francisco, E Calvo, R Sánchez-Andrade, P Díaz, R Francisco, P Díez-Baños, P Morrondo, A Paz-Silva. 2009. A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fascioliasis. *Vet J* 182, 73-78.

Arias M, P Piñeiro, GV Hillyer, JL Suárez, I Francisco, FJ Cortiñas, P Díez-Baños, P Morrondo, R Sánchez-Andrade, A Paz-Silva. 2010. An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of

cattle management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *J Parasitol* 96, 626-631.

Arias M, C Lomba, V Dacal, L Vázquez, J Pedreira, I Francisco, P Piñeiro, CF Cazapal-Monteiro, JL Suárez, P Díez-Baños, P Morrondo, R Sánchez-Andrade, A Paz-Silva. 2011. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet Rec* 168, 408-413.

Arias M, CF Cazapal-Monteiro, J Suárez, S Miguélez, I Francisco, JL Suárez, A Paz-Silva, R Sánchez-Andrade, P Mendoza de Gives. 2013. A preliminary analysis of the mixed production of spores of filamentous fungi for preventing soil-transmitted helminthzoonoses. *Biomed Res Int* 567876. doi: 10.1155/2013/567876.

Bennema SC, E Ducheyne, J Vercruyse, E Claerebout, G Hendrickx, J Charlier. 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *Int J Parasitol* 41, 225-233.

Carámbula M. 1996. Pasturas naturales mejoradas. Editorial Hemisferio Sur. Uruguay.

Castro, L., Brito, G. 2008. Auditoría de Calidad de Carne Vacuna 2007-2008. 5º Congreso de Producción, Industrialización y Comercialización de Carne "Del Campo al Plato". Instituto Nacional de Carne, Montevideo, Uruguay.

Conceição MA, RM Durão, IM Costa, JM da Costa, J. M. 2002. Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fascioliosis. *Vet Parasitol* 105, 337-343.

Conceição MA, RM Durão, IM Costa, A Castro, AC Louzã, JC Costa. 2004. Herd-level seroprevalence of fascioliosis in cattle in north central Portugal. *Vet Parasitol* 123, 93-103.

Cornelissen JB, CP Gaasenbeek, FH Borgsteede, WG Holland, MM Harmsen, WJ Boersma. 2001. Early immunodiagnosis of fascioliosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int J Parasitol* 31, 728-737.

Dias AS, JV Araújo, FR Braga, JM Araújo, AC Puppim, FM Fernandes, RF Ramos, RM Bertoneceli, RG da Silva, WR Perboni. 2012. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitol Res* 110, 663-667.

Dunkel AM, MC Rognlie, GR Johnson, SE Knapp. 1996. Distribution of potential intermediate hosts for *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in Montana, USA. *Vet Parasitol* 62, 63-70.

Eleftheratos K, G Tselioudis, C Zerefos, P Nastos, C Douvis, I Kapsomenakis. 2011. Observed and predicted climate changes in Uruguay and adjacent areas. *Hell J Geosci* 45, 83-90.

Fox NJ, PC White, CJ McClean, G Marion, A Evans, MR Hutchings. 2011. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One* 6, e16126.

Greiner M, IA Gardner. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med* 45, 43-59.

Hope Cawdery MJ. 1984. Review of economic importance of fascioliasis in sheep and cattle. *Irish Vet* 3, 14-22.

INE (2012). Instituto Nacional de Estatística 2011. Lisboa, Portugal.

Kottek M, J Grieser, C Beck, B Rudolf, F Rubel. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15, 259-263.

Kuchai JA, MZ Chishti, MM Zaki, MAD Muzaffar Rasool, J Ahmad, H Tak. 2011. Epidemiological aspects of fascioliasis among cattle of Ladakh. *Global Vet* 7, 342-346.

Kuerpick B, C Fiedor, G von Samson-Himmelstjerna, T Schnieder, C Strube. 2012. Bulk milk-estimated seroprevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds and collecting of risk factor data in East Frisia, northern Germany. *Berl Munch Tierarztl* 125, 345-350.

Luzón-Peña M, FA Rojo-Vázquez, M Gómez-Bautista. 1995. Seasonal availability of *Fasciola hepatica* metacercariae in a temperate Mediterranean area (Madrid, Spain). *Zbl Vet Med B* 42, 577-585.

Marcos LA, A Terashima, G Leguía, M Canales, JR Espinoza, E Gotuzzo. 2007. *Fasciola hepatica* infection in Peru: An emergent disease. *Rev Gastroenterol Peruana* 27, 389-396.

Marley SE, RM Corwin, DP Hutcheson. 1996. Effect of *Fasciola hepatica* on productivity of beef steers from pasture through feedlot. *Agri-Practice* 17, 18-23.

Mezo M, M González-Warleta, JA Castro-Hermida, L Muiño, FM Ubeira. 2011. Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Vet Parasitol* 180, 237-242.

Nari A, H Cardozo, MA Solari, C Petraccia, D Acosta. 1986. Estudio preliminar sobre el desarrollo de *Limnaea viatrix* D'Orbigny (1835) en condiciones controladas de temperatura y humedad. *Veterinaria* 22, 13-17.

OMS, Organización Mundial de la Salud. 1997. Vector control. Methods for use by individuals and communities. World Health Organization, Geneva, Pp 337-356.

Paz-Silva A, GV Hillyer, R Sánchez-Andrade, JR Rodríguez-Medina, M Arias, P Morrondo, P Díez-Baños. 2005. Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol Res* 95, 129-135.

Paz-Silva A, GV Hillyer, MS Arias, R Sánchez-Andrade, J Pedreira, JL Suárez, C Lomba, P Díaz, I Francisco, P Díez-Baños, P Morrondo. 2007. A cross-sectional study of fascioliasis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. *Int J Appl Res. Vet M* 5, 52-56.

Rapsch C, G Schweizer, F Grimm, L Kohler, C Bauer, P Deplazes, U Braun, PR Torgerson. 2006. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *Int J Parasitol* 36, 1153-1158.

Reid JFS, JD Dargie. 1995. Como os estágios adultos de *Fasciola hepatica* afetam a saúde e a produtividade do bovino. *Hora Vet* 15, 23-26.

Rodríguez DC, N Pino, G Peñuela. 2012. Microbiological quality indicators in waters of dairy farms: detection of pathogens by PCR in real time. *Sci Total Environ* 427-428, 314-318.

Salimi-Bejestani MR, P Cripps, DJ Williams. 2008. Evaluation of an ELISA to assess the intensity of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Vet Rec* 162, 109-111.

Sánchez-Andrade R, A Paz-Silva, JL Suárez, R Panadero, P Díez.-Baños, P Morrondo. 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol* 93, 39-46.

Sánchez-Andrade R, A Paz-Silva, JL Suárez, R Panadero, J Pedreira, C López, P Díez-Baños, P Morrondo. 2002. Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Vet Res Commun* 26, 361-370.

Sanchís J, S Miguélez, MA Solari, P Piñeiro, MI Macchi, G Maldini, J Venzal, P Morrondo, P Díez-Baños, R Sánchez-Andrade, A Paz-Silva, MS Arias. 2011. Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay). *Rev Ibero-Latin Parasitol* 70, 163-171.

Sariözkan S, C Yalçin. 2011. Estimating the total cost of bovine fasciolosis in Turkey. *Ann Trop Med Parasitol* 105, 439-444.

Schweizer G, U Braun, P Deplazes, PR Torgerson. 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet Rec* 157, 188-193.

Sen M, A Yildirim, Z Bişkin, O Düzlü, A Inci. 2011. The investigation of fasciolosis in cattle by copro-ELISA and stool examination techniques around the Derinkuyu region. *Türkiye Parazitoloj Derg* 35, 81-85.

Thrusfield M. 2005. *Veterinary epidemiology*. 3^a ed. Blackwell, Oxford, UK.

Cuadro 1. Seroprevalencia de fasciolosis en ganado vacuno mantenido en régimen extensivo de Uruguay (clima húmedo subtropical) y Portugal (clima mediterráneo).

Seroprevalence of fasciolosis in cattle extensively managed from Uruguay (humid subtropical climate) and Portugal (mediterranean climate).

Raza	Uruguay (N= 1.192)					Portugal (N= 473)				
	N	PV		OR		N	PV		OR	
		%	IC 95%	Valo	IC 95%		%	IC 95%	Val	IC 95%
Angus	328	48	43 – 53	0,7	0,5 – 0,9					
Hereford	427	56	51 – 61	1,0	0,8 – 1,3					
Holstein	289	68	64 – 73	2,0	1,5 – 2,6					
Cruces	148	47	42 – 52	0,7	0,5 – 1,0	223	57	51-64	2,2	1,5 – 3,1
Limousin						250	38	32-44	0,5	0,3 – 0,7
Estadística			$\chi^2 = 30,076, P = 0,001$					$\chi^2 = 17,066, P = 0,001$		

Edad (años)

< 2	15	87	69 – 100	$\chi^2 = 3,509$	7	57	20 – 94	$\chi^2 = 1,862$
2 - 4	8	100		P= 0,173	7	71	38 – 100	P= 0,394
> 4	17	100			3	100		

Sexo

Vaca	34	97	91 – 100	$\chi^2 = 2,023$	11	73	46 – 99	$\chi^2 = 0,069$
Toro	6	83	54 – 100	P= 0,155	6	67	29 – 100	P= 0,793

Aptitud

Lechera	9	100		$\chi^2 = 0,611$				$\chi^2 = 0,383$
Cárnica	31	93	85 – 100	P= 0,434	12	75	51 – 100	P= 0,536
Cría					5	60	17 – 100	

Los resultados se expresan como porcentajes y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Prevalencia verdadera (PV).

J. SANCHÍS, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, M.I. MACCHI, P. PIÑEIRO, J.L. SUÁREZ, C. CAZAPAL-MONTEIRO, G. MALDINI, J.M. VENZAL, A. PAZ-SILVA, M.S. ARIAS. (2013). **Infection by Paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain.** Vet Parasitol. 191: 165 - 171. [doi:10.1016/j.vetpar.2012.07.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.028)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712004086>

J. SANCHÍS, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, M.I. MACCHI, P. PIÑEIRO, J.L. SUÁREZ, C. CAZAPAL-MONTEIRO, G. MALDINI, J.M. VENZAL, A. PAZ-SILVA, M.S. ARIAS. (2013). **The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle.** Vet Parasitol. 197: 126 - 129. [doi:10.1016/j.vetpar.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.011)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713003622>

5. Resumen y Discusión

Ante la escasa y poco actualizada información acerca de las trematodosis que afectan al ganado bovino en el Departamento de Salto (Uruguay), eminentemente agrícola, en el **primer ensayo** se recogieron muestras de sangre de 386 vacas de aptitud cárnica, láctea y mixta, pertenecientes a 13 explotaciones. Los sueros se analizaron con un ELISA y antígenos de excreción/secreción de adultos de *F. hepatica*, demostrándose una seropositividad individual del 67% (IC95% 62, 72), con los porcentajes más elevados en ganado de raza Angus y en los terneros menores de 2 años. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras regiones como el Noroeste de España (PAZ-SILVA y cols., 2007), Gales (McCANN y cols., 2010), Australia (MOLLOY y cols., 2005), Puerto Rico (HILLYER y cols., 1996) o el norte de Egipto (EL-AZIZ y cols., 2001).

El análisis simultáneo demostró que la **raza**, y a continuación la **edad** son los factores más influyentes en el aumento de la seroprevalencia. Las diferencias observadas en función de la raza parecen atribuibles al manejo de los animales. La fasciolosis en los hospedadores definitivos se produce por la ingestión de metacercarias adheridas al forraje o vehiculadas por el agua de bebida. En el Departamento de Salto, prácticamente todos los bovinos se alimentan de forma permanente en los pastos y el agua de bebida procede de manantiales o arroyos. Las vacas de producción lechera (Frisonas) constituyen una excepción, puesto que generalmente se mantienen en régimen semi-intensivo y en los bebederos de la sala de ordeño el agua suele ser potable, reduciéndose de este modo el riesgo de ingestión de metacercarias.

El hallazgo de que el porcentaje de animales que mostraba exposición al trematodo hepático disminuía con la edad de los bovinos coincide con las observaciones de SÁNCHEZ-ANDRADE y cols. (2002) en el Noroeste de España. Aunque los terneros consumen relativamente menor cantidad de pasto, en el presente trabajo se detectó la mayor seropositividad en los animales de esta edad, lo que indica que los terneros se mantienen en zonas con elevada presencia de metacercarias, favoreciendo su exposición a los antígenos del trematodo. No existe una opinión unánime acerca del posible rol de la respuesta inmunitaria frente a la reinfección por *Fasciola*, encontrándose autores que establecen una cierta protección con la edad (LANGLEY y HILLYER, 1989) y otros que afirman lo contrario (CLERY y cols., 1996; MORIENA y cols., 2007).

El análisis de sensibilización frente a *F. hepatica* en función de las explotaciones demostró una seropositividad del 92%, con valores inferiores en las explotaciones de producción lechera. Estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas del Noroeste de España (PAZ-SILVA y cols.,

2007), mientras que en la región vecina del Norte de Portugal se obtuvieron valores entre el 11 y el 48% (CONCEIÇÃO y cols., 2004).

Las condiciones climáticas en el Uruguay favorecen el crecimiento de especies vegetales forrajeras prácticamente todo el año (CARÁMBULA, 1996), que se aprovecha para la alimentación del ganado vacuno mantenido en régimen semi-extensivo o extensivo. Estas condiciones permiten, además, la supervivencia de algunos moluscos del género *Lymnaea* (hospedadores intermediarios de *F. hepatica*), como se ha comprobado en algunas granjas del país (HEINZEN y cols., 1994).

Nuestros resultados señalan que el ciclo de *F. hepatica* no se interrumpe en ninguna época del año, aunque parece que la fase externa se alarga en el invierno, cuando se registran las temperaturas más bajas. Las posibilidades de ingestión de metacercarias son elevadas en el ganado vacuno de Salto, puesto que 2 de cada 3 animales tienen anticuerpos frente a *F. hepatica*. Resulta de indudable interés tener en cuenta que al final del verano el pasto verde queda restringido a zonas en las que existen manantiales o acequias, que por otra parte, son los hábitats idóneos para las limneas, de modo que los bovinos al alimentarse en estas áreas limitadas tienen mayor riesgo de ingerir metacercarias de *F. hepatica*, lo que podría explicar la elevada seroprevalencia obtenida. Investigaciones desarrolladas en la provincia de León (España) atribuyen a la instalación de sistemas de irrigación para fomentar nuevos cultivos el incremento de la humedad observado en las últimas décadas, causa probable para explicar la elevada prevalencia de fasciolosis ovina en esta provincia (VARA DEL RÍO, 2007; MARTÍNEZ-VALLADARES y cols., 2013).

A pesar de la disponibilidad de diferentes fasciolicidas con notable eficacia, la temporalidad de su efecto requiere la aplicación de otras medidas sobre el medio. El ganado vacuno de aptitud lechera sólo puede tratarse durante el periodo de secado, por lo que el intervalo entre la administración de fasciolicidas excede el tiempo de prepatencia de *F. hepatica*, y los animales se re infectan y continúan eliminando huevos en las heces (PARR y GRAY, 2001; ARIAS y cols., 2010).

En los últimos años se ha producido un incremento de las reses que se mantienen en extensivo, en parte debido al aumento del coste de los concentrados alimentarios provocado por el alza del precio de los cereales. La experiencia adquirida en el ensayo anterior nos llevó a considerar un **segundo ensayo** para evaluar el riesgo de exposición a *Fasciola hepatica* en vacuno en extensivo de dos zonas climáticas diferentes, Uruguay (clima subtropical húmedo, 1.192 sueros) y Portugal (clima mediterráneo, 473

muestras). Para hacer posible la comparación de los resultados obtenidos, se empleó un antígeno unitario, una proteína recombinante de 2,9 kDa del tegumento de *Fasciola* (FhrAPS) (PAZ-SILVA y cols., 2005).

Se comprobó que casi todas las granjas de Uruguay tenían rumiantes seropositivos, con una prevalencia individual del 56%, similar a los resultados obtenidos en el **primer ensayo** que demostraron, con antígenos de excreción/secreción de trematodos adultos, una seroprevalencia individual del 67% en la región de Salto (noroeste de Uruguay) (SANCHÍS y cols., 2011a). Asimismo, entre los años 2007 y 2008, en los mataderos de Uruguay se decomisó el 37,4% de hígados de bovinos debido a las lesiones provocadas por *F. hepatica* (CASTRO y BRITO, 2008).

En Portugal se ha diagnosticado la fasciolosis bovina mediante el uso de pruebas coprológicas y en mataderos (CONCEIÇÃO y cols., 2002; ARIAS y cols., 2011). El presente trabajo mostró que el 71% de las granjas tenían bovinos con anticuerpos frente al trematodo hepático, con una exposición individual de los animales del 47%. Estos valores son similares a los señalados previamente en el centro-norte de Portugal (CONCEIÇÃO y cols., 2004), y más bajos que los encontrados en una región endémica fronteriza del noroeste de España (ARIAS y cols., 2010).

En el Uruguay se comprobaron porcentajes significativamente más elevados en vacas lecheras Holstein de 2-4 años, en tanto que en Portugal, se obtuvieron en bovinos resultado de cruces de distintas razas para la producción de carne, con 2-4 años de edad. Un aspecto a destacar es que el ganado Holstein en las granjas de Uruguay ingiere agua de bebederos próximos a las salas de ordeño, mientras que el resto de bovinos lo hace de pozos naturales. Debemos de considerar que la infección por *F. hepatica* puede producirse por la ingestión de hierba o agua contaminada (MARCOS y cols., 2007). También se ha demostrado la presencia de metacercarias de *F. hepatica* en el agua suministrada a granjas de Colombia (RODRÍGUEZ y cols., 2012). Por el contrario, los bovinos Cruce de Uruguay pastan en praderas naturales que se secan durante el verano, lo que probablemente reduzca el riesgo de infección. Al contrario, en Portugal los Cruces alcanzaron las seroprevalencias más elevadas, en coincidencia con lo demostrado en un área próxima del noroeste de España (SÁNCHEZ-ANDRADE y cols., 2002), posiblemente porque en los pastos se mantienen humedales durante todo el año, y los animales destinados a la producción de carne rara vez se desparasitan (ARIAS y cols., 2010).

La coincidencia en la observación de mayores seroprevalencias en rumiantes de 2-4 años en ambos países concuerda con investigaciones previas en regiones endémicas (Galicia), en las que utilizando un

ELISA con el mismo antígeno recombinante (FhrAPS) se comprobó la exposición al trematodo hepático en más del 40% de los terneros (SÁNCHEZ-ANDRADE y cols., 2000, 2002).

Las condiciones climáticas influyen en la actividad de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios, y en consecuencia sobre la emisión de metacercarias (fase infectiva) (FOX y cols., 2011). En zonas con clima subtropical húmedo (Uruguay) parecen concurrir condiciones que favorecen la presencia de caracoles limneidos todo el año (NARI y cols., 1986), por lo que la seroprevalencia más alta podría atribuirse a una mayor contaminación de los pastos con metacercarias de *F. hepatica*. Sin embargo, las bajas temperaturas que se registran durante el invierno en las zonas de clima mediterráneo inducen a los caracoles a enterrarse en el barro (OMS, 1997), reduciéndose de este modo la emisión de cercarias al medio. Como consecuencia, la infección de las vacas dependerá sobre todo del final de la hibernación de los caracoles infectados, porque a pesar de la resistencia de las metacercarias al frío, en zonas con este clima el porcentaje de metacercarias que sobreviven viables en el pasto hasta la primavera siguiente es inferior al 30% (LUZÓN-PEÑA y cols., 1995; DUNKEL y cols., 1996).

El control de la fasciolosis radica en protocolos de desparasitación. En la estimación de la prevalencia basada en la detección de anticuerpos debemos de tener en cuenta que los hospedadores definitivos se tratan con fasciolicidas. Estudios realizados en España por ARIAS y cols. (2009), señalan que, aunque los valores de anticuerpos se reducen significativamente en rumiantes tratados con Albendazol o Netobimin, no llegan a alcanzar los valores correspondientes a animales no infectados. En ambos países, se recomiendan dos tratamientos fasciolicidas al año, en primavera y en otoño, aunque en Uruguay generalmente sólo se desparasitan los animales menores de tres años, con Nitroxynil. No se han observado diferencias en cuanto al sexo de los animales, pese a que los toros rara vez se desparasitan en Uruguay, y las vacas Holstein sólo pueden recibir tratamiento durante el secado.

Los datos recogidos en el presente trabajo señalan que el ganado vacuno en extensivo tiene un riesgo importante de exposición a *F. hepatica*, especialmente en zonas con clima subtropical húmedo. La elevada seroprevalencia de los terneros, con independencia de las condiciones climáticas, indica que los animales ingieren metacercarias desde que comienzan el pastoreo, por lo que resulta necesario reducir la contaminación de los pastos por metacercarias de *F. hepatica*, dado que la desparasitación proporciona sólo una solución a corto plazo, y la construcción de cercas para evitar que el ganado acceda a las áreas húmedas es una opción rara vez contemplada. Se concluye que es necesario adoptar

medidas frente a las formas del parásito que se encuentran en el medio, y combinarlas con programas de desparasitación eficaces. En los últimos años se han descrito algunos procedimientos prometedores de control biológico basados en la utilización de hongos saprófitos capaces de romper la cubierta de huevos de algunos parásitos y destruir el embrión (DIAS y cols., 2012; ARIAS y cols., 2013). Con la destrucción de los huevos de *F. hepatica*, se evitaría la infección de los caracoles limneidos y por lo tanto la emisión de cercarias. Existen investigaciones en marcha para establecer la forma adecuada que permita asegurar la presencia de estos hongos en las heces de los animales en pastoreo.

Los trematodos hepáticos de la familia Fasciolidae desarrollan una fase externa de su ciclo biológico idéntica a la de los trematodos gástricos Paramphistomidae. A tenor de los resultados obtenidos en el análisis de la fasciolosis en el Uruguay, cabría considerar la posibilidad de que la infección por paranfistómidos pudiese ser también importante, y pese a ello no recibir la atención necesaria. Debido a la ausencia de estudios previos, se decidió conducir un **tercer ensayo** con el que, apoyándonos en la experiencia adquirida en Galicia (España) desde hace años, se pudiese aportar información novedosa y actual del riesgo de exposición a trematodos gástricos en el ganado bovino del Uruguay. Para ello, se recogieron muestras de heces y de sangre de 374 bovinos en Salto (NO Uruguay) y de 429 bovinos de Galicia (NO España). Las muestras se analizaron por sedimentación y ELISA con antígenos de excreción/secreción de ejemplares adultos de *Calicophoron daubneyi*, paranfistómido identificado en la región española.

En el Uruguay, el porcentaje de rumiantes positivo a coprología fue del 7% (IC 95%: 5, 10), similar al detectado en Perú (PINEDO y cols., 2010). Los mayores valores correspondieron a los cruces Hereford con Angus (OR = 3,5) y a los bovinos de mayor edad (> 3,5 años). En Galicia, el 26% (22, 30) de los bovinos eliminaban huevos del trematodo en las heces, y las prevalencias más altas se obtuvieron en el ganado de 2,5-7 años. Esta prevalencia resultó superior a la observada en estudios previos en la misma región (19%; DÍAZ y cols., 2007), lo que significa que la paranfistomosis bovina está aumentando en Galicia.

La evidencia de huevos de paranfistomos en las heces constituye un signo inequívoco de infección patente por parásitos adultos en los hospedadores definitivos. Si se tiene en cuenta que un porcentaje variable de metacercarias es capaz de alcanzar su localización definitiva y llegar al estado adulto (0-34%, con una media del 12%) (PARAUD y cols., 2008), se podría dar una situación de subestimación del

riesgo de rumiantes expuesto a los trematodos gástricos si sólo se utilizan pruebas copromicroscópicas, y es aconsejable evaluar la existencia de anticuerpos IgG frente a los antígenos de estos helmintos.

Mediante ELISA se puso de manifiesto una seroprevalencia global del 29% (25, 34) en los rumiantes americanos, con valores más altos en los frisonos (OR = 3), y los bovinos jóvenes (<2,5 años). En los bovinos españoles, el 55% (50, 59) tenían anticuerpos frente al trematodo gástrico, y la seroprevalencia más alta se observó entre los bovinos menores de 6 años.

Se concluye que la paranfistomosis ha aumentado en el ganado bovino del noroeste de España, seguramente en parte debido a la ausencia de un tratamiento eficaz contra el trematodo. Por el mismo motivo, se alerta acerca de la necesidad de evitar que los bovinos se infecten por *Paramphistomidae* spp. en Uruguay y para ello se indica que se deben adoptar medidas de manejo que eviten la ingestión de las metacercarias. Se están realizando estudios complementarios para identificar las especies que afectan a rumiantes en Uruguay.

La infección por trematodos gástricos implica la presencia de caracoles limneidos como hospedadores intermediarios, que participan también en la transmisión de *Fasciola hepatica*. Las zonas húmedas que garantizan la supervivencia de estos caracoles son áreas de riesgo de ambos trematodos. Resulta escasa la información sobre paranfistomosis bovina, como se refleja en un total de 121 registros en la base de datos PubMed, por 964 en relación con fasciolosis. La investigación actual se llevó a cabo en ganado de dos regiones agrícolas con distintas condiciones de manejo, en especial en las posibilidades que tienen los animales de alimentarse en los pastos. Ya se ha mencionado que las condiciones climáticas del Uruguay favorecen el crecimiento del forraje prácticamente durante todo el año, permitiendo el mantenimiento del ganado (incluso bovinos lecheros) bajo un régimen extensivo o semi-extensivo. Por el contrario, en Galicia el vacuno de leche tiene un acceso más restringido al pasto, al contrario de lo que sucede con los de aptitud cárnica, que se mantienen durante todo el día al aire libre.

A pesar de la diferencia en la gestión de los bovinos, se pueden destacar algunas analogías en las dos regiones. Quizás la más sorprendente resultó que la seroprevalencia más alta se registró entre las frisonas, vacas que por su aptitud reciben la mejor alimentación, pastan en las zonas verdes en las que seguramente se localizan biotopos adecuados para los hospedadores intermediarios. También en ambas áreas de estudio se detectó que la exposición a la infección aumentaba con la edad, posiblemente porque los animales que llevan más tiempo en el pasto, es decir, los de más edad, tuvieron más oportunidades de ingerir metacercarias (KEYYU y cols., 2006). Resulta curioso comprobar

que, tal como sucedía hace algunos años en Galicia, en el Uruguay actualmente no hay tratamientos específicos contra los parafistomos, tal vez debido a que no se hace un diagnóstico correcto al emplear únicamente técnicas copromicroscópicas que pueden inducir a considerar los huevos de parafistómidos como huevos de *F. hepatica*. En el **tercer ensayo** se demostró que la seroprevalencia de parafistomosis está aumentando en el noroeste de España, lo que se podría achacar a que se sigue manteniendo un diagnóstico erróneo y por consiguiente utilizando tratamientos ineficaces. Esta situación parece ser la que en un futuro se describirá en el país americano, si no se aplican las medidas oportunas.

En los últimos años han aumentado las publicaciones que demuestran la coexistencia de trematodos hepáticos y gástricos, y alertan de la necesidad de buscar soluciones (DORNY y cols., 2011; RONDELAUD y cols., 2013; GORDON y cols., 2013). De la necesidad de actualizar la información acerca del control de la parafistomosis, unido a la posibilidad de probar la eficacia frente a parafistomos en vacas con infección natural, surgió la idea de evaluar la eficacia de cuatro productos que se emplean con frecuencia frente a *F. hepatica*. El tratamiento con Oxiclozanida es el recomendado para el tratamiento de la parafistomosis en ganado vacuno (DÍAZ y cols., 2006; MURPHY y cols., 2008) sin embargo en algunos países como España o Argentina no se comercializa. Para ello, se realizó un **cuarto ensayo** en el que se utilizaron setenta vacas adultas frisonas que se trataron durante la fase de secado (19 con Albendazol; 23 con Netobimin; 13 con Closantel y 15 con Oxiclozanida), mientras que otras 21 permanecieron sin tratar como testigos. La eficacia antihelmíntica se determinó mediante la estimación de los valores de reducción del recuento fecal de huevos (FECR, *Faecal Egg Count Reduction*) para cada uno de los antihelmínticos. También consideramos interesante calcular la reducción del número de vacas positivas por copromicroscopía (CPCR).

En el cuarto ensayo, se observó que la desparasitación con Albendazol o Netobimin no es eficaz frente a *C. daubneyi*, puesto que en los animales que recibieron estos antihelmínticos la eliminación de huevos no cesó durante todo el estudio, oscilando los valores del FECR de 0% a 26%, y más del 60% fueron positivas durante las catorce semanas que duró el estudio, lo que indica que estos antihelmínticos no son eficaces ni frente a los adultos ni contra las fases inmaduras de *C. daubneyi*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por MAGO y REYNAL (1990), que encontraron que la reducción del FECR era sólo del 9% después de la administración de una dosis de 10 mg Albendazol / Kg p.v.

En el presente estudio ninguna de las vacas desparasitada con Closantel eliminó huevos dos semanas después del tratamiento. Investigaciones previas realizadas por ROLFE y BORAY (1987), indican que la dosis de 7.5 mg/Kg p.v no es eficaz frente al trematodo ruminal. Esta discrepancia entre los resultados puede deberse a que en el presente trabajo se valoró la eficacia teniendo en cuenta el porcentaje de reducción de eliminación de huevos, también puede atribuirse a las diferentes dosis utilizadas o a la vía de administración del closantel (oral en el presente estudio e intrarruminal en el caso de ROLFE y BORAY, 1987).

Los mejores resultados se lograron con Closantel y Oxiclozanida, con valores de 97 a 99% FECR en concordancia con lo obtenido por ROLFE y BORAY (1987) y CPCR (porcentaje de reducción de bovinos positivos por coprología) de 85-93%. En distintos estudios se ha comprobado que la oxiclozanida es el antihelmíntico de elección frente a la parafistomosis (DÍAZ y cols., 2006; MURPHY y cols., 2008). La administración de Oxiclozanida a vacas Holstein infectados de forma natural por *C. daubneyi* redujo la eliminación de huevos en un 98-99% a partir de la primera semana después del tratamiento, resultados que coinciden con los de ROLFE y BORAY (1987).

Ninguna de las vacas que recibieron Closantel eliminaban huevos de *C. daubneyi* a las dos semanas post-tratamiento. Al observar una eficacia similar con Closantel y Oxiclozanida frente a *C. daubneyi*, nos llevó a recomendar la administración de Closantel en aquellos países donde Oxiclozanida no está disponible.

No existen criterios unánimemente aceptados para establecer el éxito de un tratamiento fasciolicida; por ello se usan los establecidos para los nematodos, fundamentalmente la reducción en el recuento de huevos en heces (FECR) (GORDON y cols., 2013). Varios factores pueden influir en los valores de FECR, como los recuentos de huevos (EPG) pre-tratamiento o el número de animales que continúen siendo positivas después de haber sido desparasitados. Por lo tanto, altos porcentajes de FECR podrían reflejar un número bajo de individuos que eliminan cantidades importantes de huevos, o un número elevado de animales tratados con bajas eliminaciones (EPG). Otra desventaja de la estimación del porcentaje de este parámetro (FECR) es que está asociado con la presencia de trematodos adultos en el hospedador definitivo. Como consecuencia, no se puede valorar el efecto que el antihelmíntico tiene sobre los estadios inmaduros. En esta investigación, el hallazgo de que 7% y el 15% del ganado eliminaron huevos de *C. daubneyi* después de recibir Oxiclozanida y Closantel, respectivamente, corrobora que son eficaces contra trematodos adultos rumen. Debido a que no se observaron variaciones en la eliminación de huevos ni tampoco en el número de animales positivos a lo largo de las catorce semanas post-tratamiento, se puede concluir que la Oxiclozanida y el Closantel son eficaces

frente a las formas inmaduras de parafistómidos. Por el contrario, más del 60% de las vacas permanecieron positivas después del tratamiento con Albendazol o Netobimin, lo que sugiere que estos antihelmínticos tienen un efecto reducido sobre los juveniles y / o adultos del trematodo ruminal. Además de la eficacia, otro punto crítico con respecto al control de los parásitos en el ganado lechero es el tiempo de supresión. Mientras que para el Closantel el periodo de supresión es superior a 30 días, sólo se necesitan 3 días para la Oxiclozanida (CHARLIER y cols., 2012), lo que refuerza la recomendación de administrar Closantel en aquellos países donde la Oxiclozanida no se puede adquirir.

6. Summary and Discussion

The main objective in the current investigation consisted of gaining updated information about trematodosis affecting cattle in the Department of Montevideo (Uruguay). In the first assay blood samples from 386 cows (meat, dairy and double aptitude) belonging to 13 farms were collected. Sera were analyzed with an ELISA and excretory/secretory antigens of adult *F. hepatica* flukes. An individual seropositivity of 67% (95% CI 62, 72) was demonstrated, with the highest percentages in Angus breed cattle and calves minors 2 years. These results agree with those obtained in other regions such as northeastern Spain (PAZ-SILVA *et al.*, 2007), Wales (McCANN *et al.*, 2010), Australia (MOLLOY *et al.*, 2005), Puerto Rico (Hillyer *et al.*, 1996) or northern Egypt (EL-AZIZ *et al.*, 2001).

The simultaneous analysis of the results showed that breed and then age were the most important factors in increasing the risk of exposure to the trematode. The observed differences based on breed seem attributable to the handling of animals. Fasciolosis in definitive hosts occurs by ingestion of metacercariae in forage or conveyed by drinking water. In the Department of Salto, virtually all cattle feed permanently in pasture and drinking water comes from springs or streams. Dairy cows (Friesian) become an exception, since they are usually kept in semi-intensive regimes and they can take potable water from the troughs of the milking parlor, thereby reducing the risk of ingestion of metacercariae.

The finding that the percentage of cattle animals exposed to the liver fluke decreased with age agrees with the observations of SÁNCHEZ-ANDRADE *et al.* (2002) in northwestern Spain. Although calves consume relatively smaller amount of grass, in the present study as seropositivity was detected in animals of this age, indicating that calves are kept in areas with elevated presence of metacercariae, favoring their exposure to antigens of the trematode. There is no consensus about the possible role of the immune response against reinfection by *Fasciola*, and some authors establish some protection with age (LANGLEY, and Hillyer, 1989) while others claim otherwise (CLERY *et al.*, 1996; MORIENA *et al.*, 2007).

The sensitivity analysis against *F. hepatica* in terms of farms showed seropositivity of 92%, with lower values in dairy farms. These results are consistent with research conducted in Northwest Spain (PAZ-SILVA *et al.*, 2007), while in the neighboring region of Northern Portugal values between 11 and 48% have been pointed (CONCEIÇÃO *et al.*, 2004).

Weather in Uruguay enhances the growth of forage almost all year (CARÁMBULA, 1996), and thus cattle kept in extensive or semi-extensive regimes are nourished. These conditions also allow the

survival of some molluscs of the genus *Lymnaea* (intermediate hosts of *F. hepatica*), as has been demonstrated in some farms in the country (HEINZEN *et al.*, 1994).

Our results indicate that the cycle of *F. hepatica* is not interrupted at any time of year, although it seems that the external phase prolongs in winter when temperatures are lower. The chances of ingesting metacercariae are high in cattle in Salto, since 2 out of 3 animals have antibodies against *F. hepatica*. It is of undoubted interest to note that at the end of summer green grass is restricted to areas where there are springs or ditches; on the other hand, these are the ideal habitats for *Lymnaea*, so cattle feeding in these areas are at higher risk of ingesting metacercariae of *F. hepatica*, which could explain the high seroprevalence obtained.

Despite the availability of different fasciolicides with remarkable effectiveness, the timing of its effect requires the application of other measures on the environment. Dairy cattle can only be dewormed during the drying period, so that the interval between administration of fasciolicides exceeds prepatency of *F. hepatica*, and the animals are challenged and passed eggs in feces again (PARR and GRAY, 2001; ARIAS *et al.*, 2010).

In recent years there has been an increase in the animals that are kept in extensive regimes, partly due to the rising cost of food concentrates caused by growing grain prices. Data collected in the previous investigation led us to consider a second assay to assess the risk of exposure to *Fasciola hepatica* among extensively managed cattle from two different climatic zones, Uruguay (humid subtropical climate, 1,192 sera) and Portugal (Mediterranean climate, 473 samples). To allow the comparison of the results obtained, a recombinant protein of 2.9 kDa tegument of *Fasciola* (FhrAPS) was used (PAZ-SILVA *et al.*, 2005).

It was found that almost all farms in Uruguay had seropositive ruminants, with a single prevalence of 56%, similar to the results obtained in the first trial by using excretory/secretory antigens of adult flukes, an individual seroprevalence of 67% in Jump region (northwestern Uruguay) (SANCHÍS *et al.*, 2011b). Also, between 2007 and 2008, a percentage of 37.4% livers of cattle were seized in Uruguay slaughterhouses due to injuries caused by *F. hepatica* (CASTRO and BRITO, 2008).

Bovine fasciolosis has been evidenced in Portugal by means of coprological tests and slaughterhouses (CONCEIÇÃO *et al.*, 2002; ARIAS *et al.*, 2011.). This study showed that 71% of farms had cattle with antibodies to the liver fluke, a solo exhibition of animals of 47%. These values are similar to those

previously identified in the north-central Portugal (CONCEIÇÃO *et al.*, 2004), and lower than those found in a border endemic region of northwest Spain (ARIAS *et al.*, 2010).

In Uruguay, significantly higher percentages were tested in Holstein dairy cows with 2-4 years, while in Portugal Crossbred cattle for meat production with 2-4 years attained the highest values. It is remarkable that Holstein cattle on Uruguay farms ingest water next to the drinkers in the milking parlor, while the rest of cattle are drinking from natural wells. It should be taken into account that *F. hepatica* infection can occur through the ingestion of water or grass containing metacercariae (MARCOS *et al.*, 2007). Recently, it has been demonstrated the presence of metacercariae of *F. hepatica* in the water supplied to farms in Colombia (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). By contrast, Uruguay Crossbred cattle graze on natural grasslands dried up during the summer, possibly reducing the risk of infection. In Portugal, Crossbred cows reached the highest seroprevalence, coinciding with that demonstrated in a close area (NW Spain; SÁNCHEZ-ANDRADE *et al.*, 2002), possibly because pasture wetlands are maintained throughout the year, and animals for meat production are rarely dewormed (ARIAS *et al.*, 2010).

The coincidence in the observation of higher seroprevalence among 2-4 yr ruminants in both countries is consistent with previous studies in endemic regions (Galicia), in which exposure to liver fluke was found in more than 40% calves (SÁNCHEZ-ANDRADE *et al.*, 2000, 2002).

Climatic conditions can influence the activity of snails acting as intermediate hosts, and consequently the emission of metacercariae (infective stages) to the environment (FOX *et al.*, 2011). In areas with humid subtropical climate (Uruguay) seem to concur conditions that favor the presence of limneidos (NARI *et al.*, 1986), so that the highest seroprevalence could be attributed to the increased contamination of pasture with metacercariae *F. hepatica*. However, low temperatures recorded during the winter in areas of Mediterranean climate induce snails burrow into the mud (WHO, 1997), thereby reducing the emission of cercariae to the environment. As a result, infection of cows depend mainly on the end of the hibernation of infected snails, because despite the resistance of the metacercariae cold in this weather areas the percentage of surviving viable metacercariae in the pasture to the next spring is below 30% (LUZÓN-Peña *et al.*, 1995; DUNKEL *et al.*, 1996).

The control of fascioliasis lies in deworming protocols. When the prevalence is estimated in the basis of detection of antibodies, it should be taken into account that the definitive hosts receive treatments with fasciolicides. Previous studies conducted in Spain by ARIAS *et al.* (2009) indicated that although

the levels of antibodies are significantly reduced in ruminants treated with Albendazole or Netobimin, there is a failure to reach values corresponding to uninfected animals. In both countries, fasciolicides are applied two times a year, in spring and autumn, although in Uruguay only animals under three years are usually dewormed, with Nitroxynil. No differences were observed regarding sex of the animals, although bulls rarely dewormed in Uruguay, and Holstein cows can only be treated during the dry period.

Data collected in this study suggest that cattle on the open range have a significant risk of exposure to *F. hepatica*, especially in areas with humid subtropical climate. The high seroprevalence of calves, regardless of climatic conditions, appears to indicate that animals eat metacercariae starting from grazing, making it necessary to reduce pasture contamination by metacercariae of *F. hepatica*, as deworming provides only a short-term effect, and building fences to prevent livestock access to wet areas is seldom contemplated. We conclude that it is necessary to take measures against forms of the parasite found in the environment, and combine them with effective deworming programs. In recent years some promising biological control procedures based on the use of saprophytic fungi with ovicidal activity have been described (DIAS *et al.*, 2012; ARIAS *et al.*, 2013.). By destroying the *F. hepatica* eggs, infection of snails limneidos is prevented and therefore the emission of cercariae. There is ongoing research to establish the appropriate way that would ensure the presence of these fungi in the feces of grazing animals.

Liver fluke of the family Fasciolidae develop its external phase identical to that of the biological cycle gastric Paramphistomidae trematodes. According to the results obtained in the analysis of fasciolosis in Uruguay, it might be considered that amphistome infection could also be important, and despite this poor attention is given. Due to the absence of previous studies, we decided to conduct a third test to provide new and current information of the risk of exposure to gastric flukes in cattle from Uruguay, based on the experience gained in Galicia (Spain) for years. In order to do this, samples of feces and blood of 374 cattle in Salto (NO Uruguay) and 429 cattle in Galicia (NW Spain) were collected. The sedimentation coprological probe was used for the analysis of the feces, whereas the sera were tested with an ELISA and excretory/secretory antigens from adult *Calicophoron daubneyi*, a paramphistomid-species identified in Spain.

In Uruguay, the percentage of ruminants positive to sedimentation was 7% (95% CI: 5, 10), similar to that detected in Peru (PINEDO *et al.*, 2010.). The highest values corresponded to Hereford x Angus cattle (OR = 3.5) and the oldest animals (> 3.5 years). In Galicia, 26% (22, 30) cows passed trematode

eggs in the feces, and the highest prevalences were obtained in those aged 2.5-7 years. This prevalence was higher than that observed in previous studies in the same region (19%; DÍAZ *et al.*, 2007), which means that bovine parafistomosis is increasing in Galicia.

The presence of eggs of paramphistomids in the feces is an unquestionable sign of current infection by adult parasites in the definitive hosts. By considering that a variable percentage of metacercariae is capable of reaching its final location and to attain the adult stage (0-34%, with an average of 12%) (PARAUD *et al.*, 2008), the real risk of ruminants are exposed to gastric flukes could be underestimated if copromicroscopical tests are only used, thus it is advisable to evaluate the existence of IgG antibodies against these helminth antigens.

An overall seroprevalence of 29% (25, 34) was observed in the American ruminants by means of ELISA, with higher values in the Frisians (OR = 3) and younger cattle (<2.5 years). In cattle from Spain, 55% (50, 59) had antibodies against the gastric fluke, and a highest seroprevalence was observed in cattle younger than 6 years. It is concluded that parafistomosis has increased in cattle from northwestern Spain, probably in part due to the absence of successful treatments against trematode. For identical argument, it is needed to prevent the infection of cattle in Uruguay by Paramphistomidae spp. trematodes, and as a consequence appropriate management measures are required to avoid the ingestion of metacercariae. Further studies are in progress to identify the amphistomid-species affecting bovines in this country.

Infection by gastric trematode requires the presence of limneid snails as intermediate hosts, which are also involved in the transmission of *Fasciola hepatica*. The wetlands that ensure the survival of these snails are risk areas of both flukes. There is little information on bovine parafistomosis, as reflected in a total of 121 entries in the PubMed database, 964 relative to fasciolosis. The current research was conducted in two agricultural regions cattle with different livestock management conditions, particularly in the possibilities of feeding animals on pasture. It has already been mentioned that climatic conditions in Uruguay enhance the growth of forage almost throughout the year, allowing the maintenance of livestock (including dairy cattle) under extensive or semi-extensive regime. By contrast, in Galicia dairy cattle has a narrower grass, contrary to what happens with beef cattle, which are held all day outdoor access.

Despite the difference in the management of cattle, we can highlight some similarities in the two regions. Perhaps the most surprising result consisted of the highest seroprevalence was recorded

between Friesian cows for their ability to get the best food, grazing in the green areas which certainly suitable biotopes are located to the intermediate host. Also in both study areas was detected that exposure to infection increased with age, possibly because the animals spent more time on the grass, that is, the older animals had more opportunities for ingesting metacercariae (KEYYU *et al.*, 2006). It appears outstanding that, as happened in Galicia some years ago, there are currently no specific treatments for parafistomids in Uruguay. One possible explanation could be that application of sedimentation might lead to a misdiagnosis because of the morphological similarities between the eggs of *F. hepatica* and *Paramphistomum* spp. In the third trial it has been shown that the seroprevalence of parafistomosis is increasing in northwestern Spain, which could be attributed both to misdiagnosis and therefore administration of ineffective treatments. This situation seems to be that in the future will be described in the American country, if appropriate measures are not applied.

The demonstration of the coexistence of liver and gastric flukes is frequent in the last years, and thus the need to seek solutions (DORNY *et al.*, 2011; RONDELAUD *et al.*, 2013; GORDON *et al.*, 2013). The need to update the information about the control of parafistomosis, together with the ability to test the efficacy against parafistomids in naturally infected cows, led us the idea of evaluating the effectiveness of four products often used against *F. hepatica*. Oxyclozanide-based therapy is recommended for the treatment of parafistomosis in cattle (DÍAZ *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2008), but in some countries like Spain or Argentina is not marketed. A fourth trial was carried out in which seventy adult Frisian cows were treated during the dry phase (23 netobimin, 19 Albendazole, 13 Closantel and 15 Oxyclozanide), while other 21 remained untreated as controls. The anthelmintic efficacy was determined by estimating the values of fecal egg count reduction (FECR) for each of the anthelmintics, as well as the reduction in the number of positive cows to sedimentation (CPCR).

It has been observed that Albendazole or Netobimin are not effective against *C. daubneyi*, since the animals receiving these anthelmintics passed eggs in their feces during the entire study, and the FECR values ranged from 0% to 26%. An overall CPCR of 60% during the fourteen weeks of the study appears to indicate that these anthelmintics are not effective against adult or immature stages of *C. daubneyi*. These results agree with those obtained by WIZARD and REYNAL (1990), who found that FECR was only 9% after the administration of Albendazole (10 mg/Kg bw).

In this study none of the cows receiving the Closantel shed eggs of *Paramphistomum* two weeks after treatment. Previous investigations conducted by ROLFE and BORAY (1987) indicated the lack of efficacy against the rumen fluke at the dose of 7.5 mg/Kg bw. This discrepancy between the results may

be attributable to the different doses used, or even to the route of administration of Closantel (oral in our study and intraruminal in ROLFE and BORAY, 1987).

The best results were achieved with Closantel and Oxyclozanide, with values of 97-99% FECR in agreement with ROLFE and BORAY (1987), and 85-93% CPCr. Some studies demonstrated that Oxyclozanide is the best anthelmintic against parafistomosis (DÍAZ *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2008). The administration of Oxyclozanide to Holstein cows naturally infected by *C. daubneyi* reduced the elimination of eggs in 98-99% from the first week after treatment, which agrees with previous investigations (ROLFE and BORAY, 1987).

None of the cows receiving Closantel eliminated eggs *C. daubneyi* from two weeks post-treatment. The observation of a similar efficacy with Closantel and Oxyclozanide against *C. daubneyi* led us to recommend the administration of Closantel in countries where Oxyclozanide is not available.

There are no uniform criteria for establishing the successful of a fasciolicide; therefore the reduction in the faecal egg counts (FECr) is currently used (GORDON *et al.*, 2013). Several factors may influence the FECr values, as the counts (EPG) pre-treatment or the number of animals remaining positive after being dewormed. Consequently, high percentages of FECr may reflect a low number of individuals that pass large quantities of eggs, or large numbers of animals treated with low levels of egg-output (EPG). Another disadvantage of the estimation of this parameter (FECr) is associated with the presence of adult flukes in the definitive host. As a result, it can not be assessed the effect of the anthelmintic on immature stages. In this research, the finding that 7% and 15% of the cattle shed eggs of *C. daubneyi* after receiving Oxyclozanide and Closantel respectively corroborates their efficacy against adult rumen flukes. Because no variations were observed in the egg-output values or in the number of positive animals over the fourteen weeks after treatment, it is concluded that Closantel and Oxyclozanide are also effective against the immature stages of *C. daubneyi*. By contrast, more than 60% cows remained positive after treatment with Albendazole or Netobimin, suggesting that these anthelmintics have a reduced effect on juvenile and/or adult rumen flukes. Other critical point to consider in respect to parasite control in dairy cattle is the withdrawal period. While for the Closantel this period exceeds 30 days, only takes 3 days for Oxyclozanide (CHARLIER *et al.*, 2012).

7. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio hemos llegado a las siguientes **CONCLUSIONES**:

1^a.- La fasciolosis es un problema importante en el ganado vacuno del Uruguay, en especial en animales jóvenes y en vacas de aptitud lechera.

2^a.- El ganado vacuno mantenido en extensivo en zonas con clima subtropical húmedo tiene un riesgo importante de infección por *Fasciola hepatica*, por lo que se recalca la necesidad de aplicar medidas sobre el medio y los hospedadores intermediarios.

3^a.- La aplicación de técnicas inmunoenzimáticas hace posible la detección de infección precoz por *Fasciola hepatica* en los terneros, lo que indica un nivel elevado de presencia de metacercarias en los prados.

4^a.- Entre el ganado vacuno del Uruguay existe un riesgo medio de infección por parafistómidos, que podría llegar a incrementarse en poco tiempo si no se aplican medidas útiles frente a hospedadores intermediarios y definitivos, como ha ocurrido en Galicia.

5^a.- Netobimín y Albendazol no son eficaces frente a parafistómidos, al contrario de lo que sucede si se administran frente a *Fasciola hepatica*. La Oxiclozanida es altamente eficaz frente a las fases juveniles y adultas de trematodos gástricos.

6^a.- En áreas de riesgo de infección por trematodos (*Fasciola* y *Paramphistomum* spp.), en las que no se dispone de Oxiclozanida, es recomendable la desparasitación con Closantel por su elevada actividad frente a ambos géneros.

8. Conclusions

From the results obtained in the present study the following **CONCLUSIONS** have been reached:

- 1.- Fasciolosis is a major problem in cattle from Uruguay, especially in young animals and dairy cows.
- 2.- Cattle reared in extensive areas with humid subtropical climate has a significant risk of infection by *Fasciola hepatica*, so its emphasized the need for actions on the environment and the intermediate hosts.
- 3.- The use of immunoassays enables early detection of infection by *Fasciola hepatica* in calves, indicating a high presence of metacercariae in meadows.
- 4.- There is a medium risk level of infection by paramphistomids among cattle from Uruguay, which could increase quickly if appropriate measures are not applied against the definitive and the intermediate hosts, as has happened in Galicia.
- 5.- Netobimin and Albendazole are not effective against paramphistomids, contrary to what happens against *Fasciola hepatica*. The Oxyclozanide is highly effective against juvenile and adult stages of gastric flukes.
- 6.- In areas at risk of infection by flukes (*Fasciola* and *Paramphistomum* spp.) where Oxyclozanide is not available, deworming with Closantel it is recommended because their efficacy against both trematodes.

9. Bibliografía

- ABDEL-RAHMAN SM, O'REILLY KL, MALONE JB. (1998). Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *Am J Vet Res.* 59: 533-537.
- ABENTE HAEDO F, RODRIGUEZ DE VINCENZI AM, OSIMANI JJ, MESCIA W. (1960). Un brote epidémico en Florida de distomatosis humana por *F. hepatica*. *An Fac Med Montevideo* 45: 319-329.
- ABROUS M, RONDELAUD D, DREYFUSS G, CABARET J. (1999). Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet Res.* 30: 113-118.
- ABROUS M, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (2000). A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *J Helminthol.* 74: 189-194.
- ABUNNA F, ASFAW L, MEGERSA B, REGASSA A. (2010). Bovine fasciolosis: coprological, abattoir survey and its economic impact due to liver condemnation at Soddo municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 42: 289-292.
- ACOSTA D, CARDOZO H, NARI A, SOLARI MA. (1989). Ecología y dinámica de población de *Limnaea viatrix* D'Orbigny (1835) en un nicho ecológico del sur de Uruguay. XVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.
- ACOSTA D. (1994). Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. En: Nari, A. y Fiel, C. (Editores). *Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos: Bases Epidemiológicas para su Prevención y Control*. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay: 233-256.
- ALCAINO H, APT W. (1989). Algunos antecedentes sobre la fascioliasis animal y humana. *Monog Med Vet.* 1989; 11: 14-29.
- AMARO J, CARBALLO M, ORMAECHEA O, CAPURRO F, DIANA V, PESSANO G. (1987). Comunicación sobre presencia en Uruguay de *F. hepatica* en equinos. VIII Jornadas Veterinarias, Maldonado, Uruguay.
- AMARO J, ORMAECHEA D, CAPURRO F, DIANA V, PESSANO G, SALLUA S. (1992). Presencia y prevalencia de *Fasciola hepatica* y helmintos gastrointestinales en una muestra de equinos deportivos en el Uruguay. *Veterinaria* 28: 116.
- APT W, AGUIKRA X, FLAVIO I, ALCAÍNO H, ZULANTQ I, PATIA AP, GONZÁLEZ V, RETAMAL C, RODRÍGUEZ J, SANDOVAL J. (1993). Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. *Bol Sanit Panam.* 11: 405-414.
- ARIAS M, HILLYER GV, SUÁREZ JL, FRANCISCO I, CORTIÑAS FJ, PEDREIRA J, FRANCISCO R, MOCHALES E, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A. (2010).

- An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle-management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *J Parasitol.* 96: 626-631.
- ARIAS M, LOMBA C, DACAL V, VÁZQUEZ L, PEDREIRA J, FRANCISCO I, PIÑEIRO P, CAZAPAL-MONTEIRO C, SUÁREZ JL, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet Rec.* 168: 408.
- ARIAS M, MORRONDO P, HILLYER GV, SÁNCHEZ-ANDRADE R, SUÁREZ JL, LOMBA C, PEDREIRA J, DÍAZ P, DÍEZ-BAÑOS P, PAZ-SILVA A. (2007). Immunodiagnosis of current fascioliasis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Vet Parasitol.* 146: 46-49.
- ARIAS MS, CAZAPAL-MONTEIRO CF, SUÁREZ J, MIGUÉLEZ S, FRANCISCO I, ARROYO FL, SUÁREZ JL, PAZ-SILVA A, SÁNCHEZ-ANDRADE R, MENDOZA DE GIVES P. (2013). Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:567876.
- ARIAS MS, SUÁREZ JL, HILLYER GV, FRANCISCO I, CALVO E, SÁNCHEZ-ANDRADE R, DÍAZ P, FRANCISCO R, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, PAZ-SILVA A. (2009). A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fascioliasis. *Vet J.* 182: 73-78.
- ARIAS VÁZQUEZ MS. (2007). Obtención de proteínas recombinantes útiles para el diagnóstico de fasciolosis ovina. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela. España.
- BACIGALUPO J. (1941). La *Limnaea viatrix* d'Orbigny huésped intermediario de la *F. hepatica* en el Uruguay. *La Semana Médica*, noviembre.
- BACIGALUPO J. (1942). *Anales de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, Universidad de la República*, 4º tomo, N° 1.
- BARGUES MD, ARTIGAS P, MERA Y SIERRA RL, POINTIER JP, MAS-COMA S. (2007). Characterisation of *Limnaea cubensis*, *L. viatrix*, and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *F. hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann Trop Med Parasitol.* 101: 621-641.
- BARGUES MD, MAS-COMA S (1997). Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol.* 14: 569-577.

- BARGUES MD, MAS-COMA S, MERA Y SIERRA RL, GÓMEZ HG, ARTIGAS P (2006). Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) and its potencial impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. ABC 29: 191-194.
- BEHM CA, SANGSTER NC. (1999). Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. En: Fasciolosis. Dalton, JP. (Editor). Cabi Publishing, Oxon, 185-224.
- BENNEMA S, VERCRUYSE J, CLAEREBOU E, SCHNIEDER T, STRUBE C, DUCHEYNE E, HENDRICKX G, CHARLIER J. (2009). The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). Vet Parasitol. 165: 51-57.
- BENNEMA SC, DUCHEYNE E, VERCRUYSE J, CLAEREBOU E, HENDRICKX G, CHARLIER J. (2011). Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. Int J Parasitol. 41: 225-233.
- BENNEMA SC, SCHOLTE RG, MOLENTO MB, MEDEIROS C, CARVALHO ODOS S. (2014). *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 56: 35-41.
- BERDIE J, NARI A, CARDOZO H. (1978). Correlación entre niveles de infección de *Fasciola hepatica* y conteo de huevos en ovinos. Veterinaria 14: 125-137.
- BLACK NM, FROYD G. (1972). The possible influence of liver fluke infestation on milk quality. Vet Rec. 90: 71-72.
- BLOEMHOFF Y, DANAHER M, ANDREW FORBES, MORGAN E, MULCAHY G, POWER C, SAYERS R. (2014). Parasite control practices on pasture-based dairy farms in the Republic of Ireland. Vet Parasitol. 204: 352-363.
- BORJI H, AZIZADEH M, KAMELLI M. (2012). A retrospective study of abattoir condemnation due to parasitic infections: economic importance in Ahwaz, southwestern Iran. J Parasitol. 98: 954-957.
- BURJEL J. (2003). Coordinador Mesa Redonda del Interior: Enfermedades emergentes y reemergentes: Leptospirosis, Fascioliasis y Hantavirus; XXXII Congreso Nacional de Medicina Interna, Montevideo-Uruguay.
- CALZADA L. (1909). Distoma hepático. Rev Med Uruguay 12: 149.
- CARÁMBULA M. (1996). Pasturas naturales mejoradas. Editorial Hemisferio Sur. Uruguay.
- CARBALLO POU M. (1929). La distomatosis y equinococosis hepática en los bovinos. Anales de la Escuela de Veterinaria Año 1, 2: 70.

- CARDOZO H, NARI A. (1980). Un aporte al estudio de la epizootiología de la Fasciolosis por *F. hepatica* en dos áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria, Montevideo (Uruguay)* 16: 61-67.
- CARDOZO H, NARI A. (1987). *F. hepatica* en ovinos. En: Bonino Morlán J, Durán del Campo A, Mari J.J. Enfermedades de los lanares. Hemisferio Sur. Montevideo-Uruguay: 71-111.
- CARDOZO H, PAIVA N, ACOSTA D, ARMENTANO J. (1991). Importancia de *F. hepatica* sobre la ganancia de peso y su porcentaje de preñez al segundo entore en Ganado de carne infestados naturalmente. *Veterinaria, Montevideo (Uruguay)*: 27.
- CARON Y, LASRI S, LOSSON B. (2007). *Fasciola hepatica*: an assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Vet Parasitol.* 149: 95-103.
- CARRADA-BRAVO T, ESCAMILLA MARTÍNEZ JR. (2005). Fasciolosis: revisión clínico-epidemiológica actualizada. *Rev Méx Patol Clín.* 52: 83-96.
- CASTELLS D, NARI A. (1996). Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre diversos parámetros productivos en ovinos de recría y su impacto sobre el desempeño posterior. I Congreso Uruguayo de Producción Animal, Montevideo, Uruguay.
- CASTRO L, BRITO G. (2008). Auditoría de Calidad de Carne Vacuna 2007-2008, 5º Congreso de Producción, Industrialización y Comercialización de Carne "Del Campo al Plato", Instituto Nacional de Carne, Montevideo, Uruguay.
- CASTRO L, BRITO G. (2008). Auditoría de Calidad de Carne Vacuna 2007-2008. 5º Congreso de Producción, Industrialización y Comercialización de Carne "Del Campo al Plato", Instituto Nacional de Carne, Montevideo, Uruguay.
- CASTRO O, FRASCHERI M, HOLCMAN B. (2002). Infección experimental de *Lymnaea viator* con *F. hepatica*. Efecto sobre el crecimiento y la reproducción de los caracoles. Jornadas de Parasitología Veterinaria, Montevideo, Uruguay.
- CASTRO O, HEINZEN T, CARBALLO M. (2001). Dinámica de infección de *Lymnaea viator* con *F. hepatica* en condiciones naturales en Uruguay. *Veterinaria, Montevideo (Uruguay)* 36: 13-20.
- CHARLIER J, DE CAT A, FORBES A, VERCRUYSSSE J. (2009). Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. *Vet Parasitol.* 166: 235-240.
- CHARLIER J, DE MEULEMEESTER L, CLAEREBOUW E, WILLIAMS D, VERCRUYSSSE J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol.* 153: 44-51.

- CHARLIER J, DUCHATEAU L, CLAEREBOUT E, WILLIAMS D, VERCRUYSSSE J. (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev Vet Med.* 78: 57-66.
- CHARLIER J, HOSTENS M, JACOBS J, VAN RANST B, DUCHATEAU L, VERCRUYSSSE J. (2012). Integrating fasciolosis control in the dry cow management: the effect of closantel treatment on milk production. *PLoS One* 7: e43216.
- CLERY D, TORGERSON P, MULCAHY G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 62: 71-82.
- CONCEIÇÃO MA, DURÃO RM, COSTA IH, DA COSTA JM. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol.* 105: 337-343.
- CONCEIÇÃO MA, DURÃO RM, COSTA IM, CASTRO A, LOUZÃ AC, COSTA JC. (2004). Herd-level seroprevalence of fasciolosis in cattle in north central Portugal. *Vet Parasitol.* 123: 93-103.
- DARGIE JD. (1986). The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. En: *Proceedings of the Sixth International Congress of Parasitology*, Canberra: 453-463.
- DE CARVALHO RR, MALDONADO A JR, OLIVEIRA-FILHO EC, RIBEIRO, PAUMGARTTEN FJE, REY L. (1998). Effects of *Euphorbia milii* látex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. *Mem I Oswaldo Cruz* 93: 235-237.
- DE LUIS, OTIN M. (1878). *F. hepatica* en vacunos del Depto de San José. *Rev Asoc Rural Uruguay* 269.
- DIAS AS, ARAÚJO JV, BRAGA FR, ARAUJO JM, PUPPIN AC, FERNANDES FM, RAMOS RF, BERTONCELLI RM, DA SILVA RG, PERBONI WR. (2012). Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitol Res.* 110: 663-667.
- DÍAZ P, LOMBA C, PEDREIRA J, ARIAS M, SÁNCHEZ-ANDRADE R, SUÁREZ JL, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, PAZ-SILVA A. (2006). Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. *Vet Parasitol.* 140: 281-288.
- DÍAZ P, PEDREIRA J, SÁNCHEZ-ANDRADE R, SUÁREZ JL, ARIAS MS, FRANCISCO I, FERNÁNDEZ G, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, PAZ-SILVA A. (2007). Risk periods of infection by *Calicophoron daubneyi* (Digenea, Paramphistomidae) in cattle from oceanic climate areas. *Parasitol Res.* 101: 339-342.
- DICOSE-MGAP (2008). <http://www.mgap.gub.uy>

- DIEA-MGAP (2007). Anuario Estadístico Agropecuario 2007. Oficina de Estadísticas Agrarias – Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/Diea/anuarios.htm>
- DIEA-MGAP (2011). Anuario Estadístico Agropecuario 2011. Oficina de Estadísticas Agrarias – Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-censo-2011,O,es,0>
- DIÉGUEZ FERNÁNDEZ L, ABREU GUIRADO O, PIÑA PÉREZ M, VÁSQUEZ CAPOTE R, FIMIA DUARTE R, RODRÍGUEZ DE LA VEGA R. (2012). Actividad molusquicida *in vitro* de *Momordica charantia* L. (Cundeamor) contra *Fossaria cubensis* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae). REDVET 13, Nº 04B. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040412B.html>
- DIRECCIÓN NACIONAL DE METEOROLOGÍA. (2008). <http://www.meteorologia.com.uy>
- DORNY P, STOLIAROFF V, CHARLIER J, MEAS S, SORN S, CHEA B, HOLL D, VAN AKEN D, VERCRUYSSÉ J. (2011). Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. Vet Parasitol. 175: 293-299.
- DREYFUSS G, VIGNOLES P, ABROUS M, RONDELAUD D. (2002). Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. Parasite 9: 113-120.
- DREYFUSS G, VIGNOLES P, RONDELAUD D. (2012). Local adaptation of the trematode *Fasciola hepatica* to the snail *Galba truncatula*. Parasite 19: 271-275.
- DUNKEL AM, ROGNLIE MC, JOHNSON GR, KNAPP SE. (1996). Distribution of potential intermediate hosts for *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in Montana, USA. Vet Parasitol. 62: 63-70.
- EL-AZIZ MM, GHAZY AA, EFFAT MM. (2001). Immunodiagnosis of bovine fasciolosis using *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens ELISA. J Egypt Soc Parasitol. 31: 327-334.
- ELEFATHERATOS K, TSELILOUDIS G, ZEREFOS C, NASTOS P, DOUVIS C, KAPSOMENAKIS I. (2011). Observed and predicted climate changes in Uruguay and adjacent areas. Hellenic J Geosci. 45: 83-90.
- ETCHECHURRY J. (1935). Distomatosis por *F. hepatica*. Arch Urug Med Cir Esp. 6: 302-308.
- FAIRWEATHER I, BORAY JC. (1999). Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. Vet J. 158: 81-112.
- FERRE I, BARRIO JP, GONZÁLEZ-GALLEGO J, ROJO-VÁZQUEZ FA. (1994). Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. Vet Parasitol. 55: 71-79.
- FOSTER AP, OTTER A, O'SULLIVAN T, CRANWELL MP, TWOMEY DF, MILLAR MF, TAYLOR MA. (2008). Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. Vet Rec. 162: 528.

- FOX NJ, WHITE PC, MCCLEAN CJ, MARION G, EVANS A, HUTCHINGS MR. (2011). Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. PLoS One. 6:e16126.
- FRANCISCO VÁZQUEZ I. (2008). Identificación de péptidos responsables de inmunidad cruzada en la parafistomosis bovina. Memoria de Licenciatura, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.
- FRANCISCO VÁZQUEZ R. (2013). Utilidad de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de infecciones parasitarias en équidos. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.
- GAMINARA A. (1929). Sobre parásitos intestinales humanos en el Uruguay. Rev Med Países Cálidos 2: 48.
- GAYO V, CUERVO P, ROSADILLA D, BIRRIEL S, DELL'OCA L, TRELLES A, CUORE U, MERA Y SIERRA R. (2011). Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. J Zoo Wildlife Med. 42: 354-356.
- GENICOT B, MOULIGNEAU F, LEKEUX P. (1991). Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscléd fattening cattle. Zentr Veterin Reihe B 38: 203-208.
- GONZÁLEZ R, PÉREZ RM, BRITO S. 2007. Fasciolosis bovina. Evaluación de las principales pérdidas provocadas en una empresa ganadera. Rev Salud Anim. 29: 167-175.
- GORDON DK, ROBERTS LC, LEAN N, ZADOKS RN, SARGISON ND, SKUCE PJ. (2013). Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. Vet Parasitol. 195: 65-71.
- HANIF F, KUMAR P, SINGH DK. (2013). Behavioural responses of *Lymnaea acuminata* against apigenin, morusin and quercetin in bait pellets. Sci J Zool. 2: 40-45.
- HAPPICCH FA, BORAY JC. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fascioliasis. The estimation of daily total eggs production of *Fasciola hepatica* and the number of adult flukes in sheep by fecal egg counts. Aust Vet J. 45: 329-331.
- HEINZEN T, CASTRO O, PEPE C, IBARBURU A. (1994). *Lymnaea columella* como hospedero intermediario de *F. hepatica* en Uruguay. XXII Jornadas Uruguayas de Buiatria. Paysandú, Uruguay.
- HERRERA RAMOS F. (1950). A propósito de tres casos de distomatosis hepática. En: Actas de la Sociedad de Gastroenterología. Montevideo, Uruguay.
- HICKS R, GILL D, OWENS F, STRASIA C, PERINO L, SMITH L, DOLEZAL H. (1989). Impact of liver flukes on the performance of feedlot steers. Stillwater, Oklahoma Agricultural Research Station, 123-126.

- HILLYER GV, SOLER DE GALANES M, BUCHÓN P, BJÖRLAND J. (1996). Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the Altiplano of Bolivia. *Vet Parasitol.* 61: 211-220.
- HOPE-CAWDERY MJ, STICKLAND KL, CONWAY A, CROWE PJ. (1977). Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. *Brit Vet J.* 133: 145-159.
- HORSCHNER F, HENNINGS R, VERSPOHL F, AVERBECK W, BOCH J. (1976). Chemotherapeutic control of fasciolosis of cattle in the Steinfurt area. II. Results after a 3-year period of treatment. *Berl Munch Tieraerztl.* 38: 21-26.
- HUTCHINSON GW, DAWSON K, FITZGIBBON CC, MARTIN PJ. (2009). Efficacy of an injectable combination anthelmintic (nitroxylinil + clorsulon + ivermectin) against early immature *Fasciola hepatica* compared to triclabendazole combination flukicides given orally or topically to cattle. *Vet Parasitol.* 162: 278-284.
- IANNACONE J, PÉREZ D. (2008). Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae). *Rev Bras Toxicol.* 21: 33-43.
- IBARRA-MORENO S, IBARRA-VELARDE F, ÁVILA-ACEVEDO JG. (2012). In Vitro Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies. *AJPS* 3.
- JAISWAL P, SINGH DK. (2009). Molluscicidal activity of nutmeg and mace (*Myristica fragrans* houtt.) against the vector snail *Lymnaea acuminata*. *J Herbs Spices Med Plants* 15: 177-186.
- JOHNSON EG. (1991). Effects of liver fluke on feedlot performance. *Agri-Practice* 12: 33-36.
- KAPLAN RM. (1994). Liver flukes in cattle: control based on seasonal transmission dynamics. *Comp Cont Educ Pract.* 16: 687-693.
- KEYYU JD, KASSUKU AA, MSALIWA LP, MONRAD J, KYVSGAARD NC (2006). Cross-sectional prevalence of helminth infections in cattle of traditional, small scale and large scale dairy farms in Iringa district, Tanzania. *Vet Res Commun.* 30: 45-55.
- KHATOON N, MUJIB B, MIRZA S. (2003). Histological changes in the liver of buffaloes by digenetic trematode *Paramphistomum cervi*. *Pakistan J Biol Sci.* 6: 1540-1543.
- KOTTEK M, GRIESER J, BECK C, RUDOLF B, RUBEL F (2006). World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Zeitsch.* 15, 259-263.

- LANGLEY RJ, HILLYER GV. (1989). Detection of circulating immune complexes by the enzyme-linked immunosorbent assay in sera from cattle infected with *Fasciola hepatica*. J Parasitol. 75: 690-695.
- LÓPEZ T, MEDINA O, SCAPIEGO W, HERNÁNDEZ O, CORRADI H, TEJEDOR A. (1990). Los veinte primeros casos de SIDA tratados en la Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina. Rev Med Uruguay 6: 13-22.
- LÓPEZ-DÍAZ MC, CARRO MC, CADÓRNIGA C, DÍEZ-BAÑOS P, MEZO M. (1998). Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. Theriogenology 50: 587-593.
- LÓPEZ-LEMES M, HERNÁNDEZ GONZÁLEZ SA, ACUÑA ZÚÑIGA AM, NARI A (1996). Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. Rev Med Uruguay 12: 37-43.
- LUZÓN PEÑA M, ROJO VÁZQUEZ FA, GÓMEZ BAUTISTA M. (1995). Seasonal availability of *Fasciola hepatica* metacercariae in a temperate Mediterranean area (Madrid, Spain). Zentralbl Veterinarmed B, 42: 577-585.
- MACKINNON JE. (1948). Tercer caso de distomatosis hepática en el Uruguay. An Inst Hig Montevideo (Uruguay) 2: 115-116.
- MAFF (1986). Manual of Veterinary Parasitology Laboratory Techniques. HMSO, London.
- MAGE C, BOURGNE H, TOULLIEU JM, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. Vet Res. 33: 439-447.
- MAGE C, REYNAL PH (1990). Lês paramphistomidés Essai d'activité dequelques anthelmintiques. GTV 4B 356: 9-11.
- MAGE C. (1990). Epidemiologie, consequences economiques et traitement de la grande douve. Symposium de Parasitologie Arkovet Ciba-Geigy, París.
- MALFATTO R, CARBALLO M, ZUNINI C, FREYRE A. (1982). Paramphistomiasis Bovina en Uruguay. 2. Vet. Uruguay 18: 47-49.
- MARCOS LA, TERASHIMA A, GOTUZZO E. (2008). Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. Curr Opin Infect Dis. 21: 523-530.
- MARCOS LA, YI P, MACHICADO A, ANDRADE R, SAMALVIDES F, SÁNCHEZ J, TERASHIMA A. (2005). Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. J Helminthol. 81: 381-386.
- MARLEY SE, CORWIN RM, HUTCHESON DP. (1996). Effect of *Fasciola hepatica* on the productivity of beef steers from pasture through feedlot. Agri-Practice 17: 18-23.
- MARTÍNEZ-PÉREZ JM, ROBLES-PÉREZ D, BENAVIDES J, MORÁN L, ANDRÉS S, GIRÁLDEZ FJ, ROJO-VÁZQUEZ FA, MARTÍNEZ-VALLADARES M. (2014). Effect of dietary supplementation with

- flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Res Vet Sci. 97: 71-79.
- MARTÍNEZ-VALLADARES M, CORDERO-PÉREZ C, CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ L, FAMULARO MR, FERNÁNDEZ-PATO N, ROJO-VÁZQUEZ FA. (2010). Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. Vet Parasitol. 174: 166-169.
- MARTÍNEZ-VALLADARES M, ROBLES-PÉREZ D, MARTÍNEZ-PÉREZ JM, CORDERO-PÉREZ C, FAMULARO MDEL R, FERNÁNDEZ-PATO N, GONZÁLEZ-LANZA C, CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ L, ROJO-VÁZQUEZ FA. (2013). Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. Parasit Vectors 6: 282.
- MAS-COMA S, BARGUES MD, VALERO MA. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. Int J Parasitol. 35: 1255-1278.
- MAS-COMA S, ESTEBAN JG, BARGUES MD. (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull World Organ. 77: 340-346.
- MCCANN CM, BAYLIS M, WILLIAMS DJ. (2010). Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. Vet Rec. 166: 612-617.
- MILLAR M, COLLOFF A, SCHOLE S. (2012). Disease associated with immature paramphistome infection. Vet Rec. 171: 509-510.
- MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. (2008). Dirección de Control de Semovientes. Declaración Jurada ante DICOSE 2008.
- MINISTERIO GANADERÍA Y AGRICULTURA (1971). Clima y Agricultura, Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger". Boletín de Divulgación 9, Colonia-Uruguay.
- MOLLOY JB, ANDERSON GR, FLETCHER TI, LANDMANN J, KNIGHT BC. (2005). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. Vet Parasitol. 130: 207-212.
- MORIENA RA, RACIOPPI O, ÁLVAREZ JD, WISNIVESKY MC, PREPELITCHI L. (2007). Fasciolosis en bovinos hembras en crecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina). Rev Vet. 18: 136-138.
- MORRONGO P, PAZ A, PEDREIRA J, SUÁREZ JL, SÁNCHEZ-ANDRADE R, PANADERO R, DÍEZ-BAÑOS P. (2000). Comparison of three diagnostic techniques in the ovine fasciolosis. 8th International

- Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Giardini (Sicily).
- MORRONDO P, SÁNCHEZ-ANDRADE R, DÍEZ-BAÑOS P, PÉREZ L, LÓPEZ C. (1994). Dynamics of *Fasciola hepatica* egg elimination and *Lymnaea truncatula* populations in cattle farms in Galicia (North-West) Spain. *Res Rev Parasitol.* 54: 47-50.
- MURPHY TM, POWER EP, SANCHEZ-MIGUEL C, CASEY MJ, TOOLAN DP, FAGAN JG. (2008). Paramphistomosis in Irish cattle. *Vet Rec.* 162: 831.
- NAPLES JM, SHIFF C, HALDEN RU. (2005). Reduction of infectivity of schistosome cercariae by application of cercaricidal oil to water. *Am J Trop Med Hyg.* 73: 956-961.
- NARI A, CARDOZO H, SOLARI MA, PETRACCIA C, ACOSTA D. (1986). Estudio preliminar sobre el desarrollo de *Limnaea viatrix* D'Orbigny (1835) en condiciones controladas de temperatura y humedad. *Veterinaria* 22: 13-17.
- NARI A, CARDOZO H. (1976). Prevalencia y distribución geográfica de la fasciolosis hepato-biliar en bovinos de carne del Uruguay. *Veterinaria, Montevideo, Uruguay*, tomo XIII: 11-16.
- NARI A, CARDOZO H. (1987). Enfermedades causadas por parásitos internos. Nematodes gastrointestinales. En: Bonino J, Durán A, Mari JJ. (Editores). *Enfermedades de los Lanares*. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay: 1-57.
- O'BRIEN B, JORDAN K, DANAHER M. (2010). Update on the use of flukicides. *Irish Vet J.* 63: 702-704.
- OAKLEY GA, OWEN B, KNAPP NHH. (1979). Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Vet Rec.* 104: 503-507.
- OLAECHEA F. (2004). *Fasciola hepatica*. Comunicación Técnica N°449 Área: Producción Animal. http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/81-hidatidosis.pdf
- OLAECHEA, F. (1993). Epidemiología y control de *F. hepatica* en la Argentina. En: Nari A, Fiel C. (Editores) *Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Bases Epidemiológicas para su Prevención y Control*. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay: 213-232.
- OLAZARRI J. (1985). Observaciones preliminares sobre Lymnaeidae (Moll. Gastr.) en el Uruguay. *Actas de las Jornadas de Zoología del Uruguay*: 28-30.
- OLAZARRI J. (1988). Los transmisores del "Saguaypé" en el Uruguay. *Almanaque del Banco de Seguros del Estado*: 212-217.
- OLIVER RULLÁN AJ. (2014). Diagnóstico de ciatostominosis mediante antígenos purificados por cromatografía FPLC. Memoria de Licenciatura. Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.

- OLLERENSHAW CB. (1975). Fascioliasis in Uruguay. A report on work undertaken during a 3 month consultancy (September 21-December 21, 1975) Project PNUD URU/72/012. "Fortalecimiento del Centro de Investigaciones Veterinarias Miguel C. Rubino" 1973-1977.
- OMS (1997). Vector control. Methods for use by individuals and communities. World Health Organization, Geneva: 337-356.
- PACKHAM AE, CONRAD PA, WILSON WD, JEANES LV, SVERLOW KW, GARDNER IA, DAFT BM, MARSH AE, BLAGBURN BL, FERRARO GL, BARR BC. (2002). Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. J Parasitol. 88: 1239-1246.
- PANTELOURIS EM (1965). The common liver fluke. Editorial Pergamon Press, International Series of Monographs on Pure and Applied Biology/Zoology Division 21: 7-10.
- PARAUD C, GAUDIN C, PORS I, CHARTIER C. (2008). Efficacy of oxclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. Vet J. 180: 265-267.
- PARFFIT JW. (1970). A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the field. Vet Rec. 87: 180-182.
- PARR SL, GRAY JS. (2000). A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. Vet Parasitol. 88: 187-197.
- PAZ-SILVA A, ARIAS M, FRANCISCO I, CORTIÑAS FJ, FRANCISCO R, MOCHALES E, SUÁREZ JL, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, SÁNCHEZ-ANDRADE R. (2010). Cross-immunity and interpretation of the diagnostics of parasitic trematodosis in ruminants by means of immunoenzymatic probes. En: George La Mann (Editor), Veterinary Parasitology. Novapublishers (USA): 302-317.
- PAZ-SILVA A, HILLYER GV, ARIAS MS, SÁNCHEZ-ANDRADE R, PEDREIRA J, SUÁREZ JL, LOMBA C, DÍAZ P, FRANCISCO I, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P. (2007). A cross-sectional study of fascioliasis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. IJARVM 5: 52-56.
- PAZ-SILVA A, HILLYER GV, SÁNCHEZ-ANDRADE R, RODRÍGUEZ-MEDINA JR, ARIAS M, MORRONDO P, DÍEZ-BAÑOS P. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fascioliasis. Parasitol Res. 95: 129-135.
- PÉREZ J, ORTEGA J, BRAVO A, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P, MORENO T, MARTÍNEZ-MORENO A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica*, with and without triclabendazole treatment. Vet Res. 36: 1-12.

- PÉREZ J, ORTEGA J, MORENO T, MORRONDO P, LÓPEZ-SÁNDEZ C, MARTÍNEZ-MORENO A. (2002). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J Comp Pathol.* 127: 30-36.
- PHIRI AM, PHIRI IK, SIKASUNGE CS, CHEMBENSOFU M, MONRAD J. (2006). Comparative fluke burden and pathology in condemned and non-condemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. *Onderstepoort J Vet Res.* 73: 275-281.
- PINEDO R, CHÁVEZ A, CASAS A, SUÁREZ F, SÁNCHEZ N, HUAMÁN H. (2010). Prevalence of trematodes of the Paramphistomatidae family in cattle of Yurimaguas district, province of Alto Amazonas, Loreto. *Rev Investig Vet Perú* 21: 161-167.
- PINEDO VICENTE RY. (2011). Paramfistomosis bovina: parasitosis emergente en el Perú. http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_PARAMFISTOMOSIS_BOVINA_PINEDO.pdf
- PIÑEIRO P, SANCHÍS J, MIGUÉLEZ S, RODRÍGUEZ MI, SUÁREZ JL, CAZAPAL-MONTEIRO C, PAZ-SILVA A, ARIAS MS, SÁNCHEZ-ANDRADE R. (2012). Control of trematode infection can be improved by means of soil fungi. XXVII Congresso de la Società Italiana di Parasitologia (SOIPA). *Mappe Parasitologiche*, 18: 85.
- RANDELL WF, BRADLEY RE. (1980). Effects of hexachlorethase on the milk yields of dairy cows in North Florida infected with *Fasciola hepatica*. *Am J Vet Res.* 41: 262-264.
- RANGEL J, MARTÍNEZ E. (1994). Pérdidas económicas por decomisos de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el Estado Tabasco. *Vet Méx.* 25: 337-341.
- RIAL B, GOMENSORO C, CHAPPE W. (1951). Distomatosis hepática humana, infección masiva familiar. *Arch Ped Urug.* 22: 257-270.
- RODRÍGUEZ BARREIRO MI. (2014). Diagnóstico de infección por *Parascaris equorum* en potros de Galicia por ELISA. Memoria de Licenciatura. Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- RODRÍGUEZ DC, PINO N, PEÑUELA G. (2012). Microbiological quality indicators in waters of dairy farms: detection of pathogens by PCR in real time. *Sci Total Environ.* 427-428: 314-318.
- ROJO-VÁZQUEZ, FERRE I. (1999). Parasitosis hepáticas: Fasciolosis. En: CORDERO DEL CAMPILLO M, ROJO-VÁZQUEZ FA. (Editores). *Parasitología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill-Interamericana, Madrid: 260-272.
- ROJO-VÁZQUEZ FA, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO-PELAYO MP. (2003). Fasciolosis. En: *Enfermedades parasitarias del ganado ovino y caprino*. Veterinaria Esteve, Ediciones GEA, Barcelona: 62-66.
- ROJO-VÁZQUEZ FA, MEANA A, VALCÁRCEL F, MARTÍNEZ-VALLADARES M. (2012). Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol.* 189: 15-38.

- ROLFE PF, BORAY JC. (1987). Chemotherapy of paramphistomosis in cattle. Aust Vet J. 64: 328-332.
- RONDELAUD D, SANABRIA R, VIGNOLES P, DREYFUSS G, ROMERO J. (2013). *Fasciola hepatica*: variations in redial development and cercarial production in relation to the geographic origin of the parasite. Parasite 20: 33.
- ROSS JG. (1970). The economics of *Fasciola hepatica* infections in cattle. Brit Vet J. 126: 13-15.
- ROY B, TANDON V. (1992). Seasonal prevalence of some zoonotic trematode infections in cattle and pigs in the north-east montane zone in India. Vet Parasitol. 41: 69-76.
- RUBINO MC. (1927). Las enfermedades de los lanares. Revista de Política Sanitaria 5: 528.
- RUG M, RUPPEI A. (2000). Toxic activities of the plant *Jathropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. Trop Med Int Health 5: 423-430.
- SABA R, KORKMAZ M, INAN D, MAMIKOĞLU L, TURHAN O, GÜNSEREN F, CEVIKOL C, KABAALIOĞLU A. (2004). Human fascioliasis. Clin Microbiol Infect. 10: 385-387.
- SALIMI-BEJESTANI MR, MCGARRY JW, FELSTEAD S, ORTIZ P, AKCA A, WILLIAMS DJ. (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. Res Vet Sci. 78: 177-181.
- SÁNCHEZ J, DOHOO I. (2002). A bulk tank milk survey of *Ostertagia ostertagi* antibodies in dairy herds in Prince Edward Island and their relationship with herd management factors and milk yield. Can Vet J. 43: 454-459.
- SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A, SUÁREZ JL, PANADERO R, PEDREIRA J, LÓPEZ C, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P. (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). Vet Res Commun. 26: 361-370.
- SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A, SUÁREZ J, PANADERO R, DÍEZ-BAÑOS P, MORRONDO P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). Vet Parasitol. 93: 39-46.
- SANCHÍS J, MIGUÉLEZ S, MACCHI MI, MALDINI G, PIÑEIRO P, VENZAL J, DÍEZ-BAÑOS P, SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A, ARIAS MS. (2011a). Estudio epidemiológico transversal de la fasciolosis en ganado vacuno del Uruguay. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (Editores), Tomo II: 768-770.
- SANCHÍS J, MIGUÉLEZ S, SOLARI MA, PIÑEIRO P, MACCHI MI, MALDINI G, VENZAL J, MORRONDO P, DÍEZ-BAÑOS P, SÁNCHEZ-ANDRADE R, PAZ-SILVA A, ARIAS MS. (2011b). Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay). Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 70: 163-171.

- SCHWEIZER G, BRAUN U, DEPLAZES P, TORGERSON PR. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet Rec.* 157: 188-193.
- SILVESTRE A, SAUVÉ C, CABARET J. (2000). Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Vet Rec.* 146: 674-675.
- SIMÓN VICENTE F. (1968). Datos sobre la ecología de *L. truncatula* y evolución larvaria de *F. hepatica* en una zona de regadío. *Rev. Iber. Parasitol.* 28: 333-348.
- SNIG-MGAP (2007). Sistema Nacional de Información Ganadera – Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. www.snig.gub.uy
- SOULÉ C, BOULARD C, LEVIEUX D, BARNOUIN J, PLATEAU E. (1989). Experimental equine fascioliasis: evolution of serologic, enzymatic and parasitic parameters. *Ann Rech Vet.* 20: 295-307.
- SPITHILL TW, DALTON JP. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today* 14: 224-228.
- STEAR MJ, DOLIGALSKA M, DONSKOW-SCHMELTER K. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134: 139-151.
- SZMIDT-ADJIDÉ V, ABROUS M, ADJIDÉ CC, DREYFUSS G, LECOMPTE A, CABARET J, RONDELAUD D. (2000). Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Vet Parasitol.* 87: 133-138.
- URQUHART GM, ARMOUR J, DUNCAN AM, JENNINGS FW. (2001). *Parasitología Veterinaria*. 2º Ed. Acribia S.A. Zaragoza (España): 117-127.
- URUGUAY SIGLO XXI (2011). http://www.uruguayxxi.gub.uy/innovaportal/v/257/1/innova.front/datos_actualizados.html
- VARA DEL RÍO MP. (2007). Control de la Fasciolosis Ovina: Estudios Sobre las Resistencias a los Fasciolicidas y Desarrollo de Técnicas Para su Detección y Métodos de Control. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Tesis Doctoral.
- VERA-MONTENEGRO Y, IBARRA-VELARDE F, RAMÍREZ-ÁVILA G, MUNGUÍA-XOCHIHUA J. (2009). In vitro fasciolicide activity of some plant extracts against newly excysted flukes. *Ann NY Acad Sci.* 1149: 180-182.
- VERCRUYSSSE J, CLAEREBOUT E. (2001). Treatment vs. non-treatment of helminth infections in cattle: defining the thresholds. *Vet Parasitol.* 98: 195-214.
- VIGNOLES P, ALARION N, BELLET V, DREYFUSS G, RONDELAUD D. (2006). A 6- to 8-day periodicity in cercarial shedding occurred in some *Galba truncatula* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res.* 98: 385-388.

- VINAUD MC, SANTOS SC, FERRI PH, SOUZA LR JR, BARRETO BJC. (2005). Avaliação da actividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do género *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercarias de *Schistosoma mansoni*. Rev Patol Trop. 34: 137-143
- WALLER PJ. (2006). From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. Vet Parasitol. 139: 1-14.
- WEHRLE RD, RICHARDS RJ. (1989). Fascioliasis: a strategic approach. 16th Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, Uruguay.
- WOLFFHÜGEL K. (1916). El carpincho (*Hydrochoerus capybara*) huésped de *F. hepatica*. Primer Congreso de Medicina Veterinaria Nacional, Montevideo, Uruguay.