

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**REPRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DEL CICLO BIOLÓGICO DE
PARAMPHISTOMUM spp.**

Por

**MOURA MERCADER, José Miguel (1) •
RODRIGUEZ FRANCIA, Dumas Oscar Diego (1) •
RIET CORREA CALABUIG, Martín (2) •**



FV-29631

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias.

Orientación: (1) Medicina Veterinaria
(2) Producción animal

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tutor de Tesis de Grado



Prof. Oscar Correa

Tesis de Grado aprobado por:

Presidente de Mesa:



Lic. Oscar Castro

Segundo Miembro (Tutor):



Prof. Oscar Correa

Tercer Miembro:



Dra. M^a Angélica Solari

Fecha:

22 de Agosto de 2012

Autores:

José Moura

Dumas Rodríguez

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 10 (diez) 



Martín Riet

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor Oscar Correa, por aportar sus conocimientos, su colaboración y por darnos la posibilidad de realizar esta tesis vinculada a un área de nuestro interés. Gracias por su generosidad al brindarnos un espacio de aprendizaje en un marco de confianza y afecto.

Al Lic. Oscar Castro por brindarnos especímenes de *Lymnaea*, sus conocimientos en la identificación de los caracoles y metacercarias así como su manejo en el laboratorio y material bibliográfico.

Al Sr. Juan Verdier por brindarnos el acceso a su establecimiento "El Ceibo" para la recolección de caracoles.

Al Dr. Decia del frigorífico Carrasco y al Sr. Fernando González propietario del frigorífico Copayan por permitirnos el ingreso a playa de faena para la recolecciones de *Paramphistomum* spp.

Al Dr. Perdigón encargado del campo experimental N° 1 Migués por darnos el ovino

A personal de la biblioteca por su colaboración en la búsqueda de material bibliográfico.

A María Jesús Sabalsagaray por realizar los cortes histológicos de los *Paramphistomum* spp.

A todos los docentes que participaron en nuestro desarrollo profesional durante toda la carrera.

A nuestras familias y amigos, por sus consejos, por estar presente en los momentos difíciles, compartir nuestras alegrías y por ser parte esencial en nuestras vidas. Gracias por su cariño, apoyo incondicional y comprensión a lo largo de este camino, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
• Taxonomía.....	11
• Morfología.....	11
• Epidemiología.....	12
• Ciclo Biológico.....	13
• Patogenia, Lesiones, Signos clínicos.....	14
• Diagnóstico.....	15
• Prevención y Control.....	16
• Tratamiento.....	17
• Importancia de la enfermedad.....	18
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro I: Drogas de acción parafistomicida.....	17
Cuadro II: Recolección de caracoles en las cinco salidas.....	25
Cuadro III: Estimación del potencial biótico.....	26

RESUMEN



Para reproducir experimentalmente el ciclo biológico de *Paramphistomum* spp. se intentó infectar un total de 750 caracoles planorbídeos (675 *Drepanotrema* spp. y 75 *Biomphalaria* spp.) y 15 *Lymnaea* spp. con miracidios procedentes de ejemplares adultos del parásito extraídos desde rúmenes de vacunos faenados en un Frigorífico cercano a la ciudad de Montevideo. Al fallar las infecciones de los caracoles se utilizaron 118 metacercarias obtenidas desde caracoles naturalmente infectados para infectar un ovino que se mantuvo estabulado. Esta infección tampoco tuvo éxito. Cincuenta ejemplares adultos del trematodo se cultivaron in-vitro durante 24 horas para realizar conteos de huevos en alícuotas para determinar que el potencial biótico ronda los 899 huevos por parásito y por día. Cortes histológicos de ejemplares extraídos desde frigorífico no dieron los resultados esperados para determinar la especie del parásito, puesto que los ángulos obtenidos no permitieron la visualización de todos los elementos diagnósticos. Se pudo fotografiar cercarias dentro de los caracoles y se filmó la salida de una de ellas desde un caracol. Se puso a punto la técnica para el mantenimiento de caracoles acuáticos en laboratorio. Las cercarias eran de tipo anfistoma y bi-oculadas, y sobre todo la morfología y las medidas de las metacercarias coincidían bastante con las de *Paramphistomum*, lo que permitió determinar con bastante certeza que *Drepanotrema depressissimum* actúa como hospedador intermediario del trematodo. A pesar de no haber podido cumplir totalmente con los objetivos planteados, se establecen antecedentes para futuras investigaciones para determinar efectos patogénicos de diferentes estadios del parásito, así como efectos terapéuticos de distintas drogas y datos epidemiológicos y ecológicos de los hospedadores intermediarios.

SUMMARY

In order to reproduce experimentally the biological cycle of the *Paramphistomum* spp., we attempted to infect a total of 750 planorbidae snails and 15 *Lymnaea* spp. with miracidia which came from adult specimens of the parasite, which has been removed from rumens of cattle slaughtered on a meat processing plant near Montevideo city.

As the infections of the snails failed, 118 metacercariae obtained from naturally infected snails were used to infect an ovine which was maintained stabled. This infection was not successful either. Fifty adult specimens of the fluke were cultivated in-vitro for 24 hours to make a count of eggs on aliquots to establish that the biological potential is about 899 eggs by parasite and by day.

The histological cuts of the specimens removed from meat processing plants did not give the expected results to determine which species does the parasite belongs to, this was because the obtained angles did not allowed the visualization of all the diagnostic elements. The cercariae could be photographed inside the snails, also the output of one of them from a snail was filmed.

The technique for the maintainance of aquatic snails on the laboratory was tuned. The morphology and type of movement of the cercariae obtained from two snails naturally infected, creates a chance that it was in fact cercariae from *Paramphistomum* spp, which allowed to determine with a lot of certainty that *Drepanotrema depressissimum* acts as an intermediate host for the trematode.

Despite not all the objectives were totally achieved, several bases have been established for future research to determine pathogenic effects from different stages of the parasite as well as therapeutic effects of different drugs, also epidemiological and ecological data of the intermediate host.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis gastrointestinales de los rumiantes constituyen uno de los principales problemas de la producción a campo (Saumell y cols., 2005).

Dentro de los endoparásitos, las gastroenteritis verminosas se presentan como la causa principal de pérdidas clínicas y subclínicas, en especial aquellas debidas a nemátodos, pero también las causadas por *Fasciola hepatica*.

Los trematodos como *F. hepatica* han sido bien estudiados en Uruguay, conociéndose al detalle su biología y epidemiología así como la ecología de sus hospederos intermediarios -*Lymnaea viator* y *L. columella*- (Acosta, 1994; Castro y cols., 2001).

Sin embargo, el otro género de trematodo diagnosticado en Uruguay, *Paramphistomum* spp. (Carballo y cols., 1981; Malfatto y cols., 1982) ha sido relegado en su estudio, tal vez por considerarlo muy poco patógeno y por lo tanto muy poco relevante en la economía agropecuaria (Paiva, 1994).

La enfermedad se asocia a zonas del este del país con rotación agrícola-ganadera, especialmente a rastrojos de arroz, zonas de campos llanos con mal drenaje (Malfatto y cols., 1982). Sin embargo, estudios realizados por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria (Correa y Castro 2007) revelan una distribución geográfica del parásito en todo el territorio Nacional.

Profesionales veterinarios han hecho llegar al Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria su preocupación sobre cuadros sospechosos de paramfistomiasis.

A pesar de ello se han reportado casos de muerte confirmados por necropsia por la fase juvenil de este parásito, siendo además indicado como el responsable de varios casos de diarreas importantes en terneros, cuando se han descartado otras causas parasitarias y no parasitarias (Archivo Veterinario del Este, 2010). También hay quienes adjudican a campo muertes por los estados adultos en animales incluso mayores, vacas de cría y novillos, y pérdidas de producción en ganado lechero (Spence y cols., 1996).

Trabajos preliminares realizados por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria que han incluido tesis de grado, han revelado que podría haber diferencias importantes sobre la ganancia de peso entre animales con el parásito y sin él, efecto éste sumatorio de ambos estados, juveniles y adultos, producto de infecciones naturales a campo. (Arrieche y Viñas, 2007).

Pero a pesar de ello, aún no se ha podido determinar cuál es el efecto real de la parasitosis por adultos o por juveniles. Para ello deberían realizarse infecciones experimentales bajo condiciones controladas. Pero esto no ha sido posible puesto que nadie en Uruguay ha podido reproducir experimentalmente el ciclo biológico de este trematodo. Tanto es así, que solo se reconoce una especie de caracol planorbideo (*Drepanotrema anatinum*) responsable de actuar como hospedador intermediario (Paiva, 1994). Sin embargo, se sospecha que otros géneros de caracoles pueden también oficiar como hospedadores larvarios, aunque varios intentos llevados a cabo en el pasado han resultado infructuosos, incluso con la especie *D. anatinum* (Castro, comunicación personal).

Uno de los inconvenientes más acuciantes es que estos caracoles también ofician como hospederos de otros anfiestómidos (como *Paramphistomum* spp.) de animales silvestres, y si bien se logra obtener cercarias y metacercarias, éstas no prosperan a

adultos cuando se les da a ingerir a los rumiantes, puesto que no son su hospedero natural.

Por todo esto creemos que conocer y reproducir el ciclo biológico de *Paramphistomum* spp. en Uruguay llevará no solo a un adelanto en el conocimiento biológico básico, si no también a un mejor conocimiento de las pautas patogénicas, epidemiológicas y de control de este parásito.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La paramfistomiasis es una enfermedad ocasionada por la infección de Trematodos pertenecientes al suborden Paramphistomata, familia Paramphistomidae. Esta enfermedad también es denominada por la literatura especializada como Anfistomiosis. A su vez se encuentran dentro de este suborden dos grandes familias, Paramphistomidae y Gastrothylacidae, siendo parásitos de rumen y retículo de rumiantes, la mayoría de los parásitos en su estado adulto viven en los pre estómagos.

Es importante diferenciar las infecciones por estados adultos que normalmente no causan enfermedad clínica de las enteritis parasitarias agudas o paramfistomiasis intestinal, que cursa con alta morbilidad y mortalidad debida a la migración de estados juveniles del parásito que se manifiesta con más prevalencia en animales jóvenes o adultos sin inmunidad previa (Paiva 1994).

El ciclo del *Paramphistomum* spp. involucra obligatoriamente a un caracol como hospedador intermediario, en general de la familia Planorbidae, familia representada por tres géneros y 10 especies en nuestro país (Scarabino 2004). Se ha encontrado *Drepanotrema anatinum* como hospedador de *P. leydeni* (Paiva, 1994) y cercarias presumiblemente de *Paramphistomum* spp. en *Drepanotrema depressissimum* y *Antillorbis nordestensis* (Castro, Comunicación personal).

La paramfistomiasis tiene una distribución cosmopolita, existiendo áreas endémicas en todos los continentes, presentándose con mas frecuencia en climas cálidos (Mauro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Para la OMS, se trata de una enfermedad emergente puesto que se incrementó el conocimiento de su extensión. En los últimos años se ha diagnosticado en países europeos como Italia, Francia o España, y americanos como México y Argentina (Paz Silva, 2006).

En Uruguay los primeros casos de paramfistomiasis fueron diagnosticados en la década del '70 en bovinos de departamentos del este y noreste del país, asociados con campos de arroceras (Carballo y cols., 1981; Malfatto y cols., 1982). Posteriormente se ha informado de brotes de esta enfermedad en departamentos del centro y litoral oeste, ya en otros sistemas de producción (campos naturales y praderas) y también en ovinos (Freyre y cols., 1989; Rimbaud y cols., 1999).

Correa y Castro (2007) determinaron mediante análisis coprológicos una alta prevalencia de *Paramphistomum* spp. en establecimientos de todo el país, llegando a la conclusión de que en los departamentos al norte del Rio Negro la prevalencia fue igual o superior al 70%, con un pico del 94,1% en los departamentos de Artigas y Salto combinados.

En el mes de junio del 2010 se presentó un brote de paramfistomiasis (*Paramphistomum* spp.) en un predio ganadero de campos bajos en la 6ª sección de Rocha, paraje Estero de Pelotas. En este brote enfermaron 150 y murieron 30 de un total de 900 terneros Hereford de 6 a 8 meses de edad, entre los meses de mayo y julio. En el mes de octubre de este mismo año se presentó también un foco en un predio ganadero de campos bajos en la misma seccional de Rocha, paraje Garzón. En el presente foco enfermaron y murieron 2 animales de un total de 250 novillos hereford de 12 a 13 meses de edad. Los animales presentaban abundante diarrea de varios días de evolución, deshidratación y manifiesta pérdida de estado corporal. A la necropsia, las principales lesiones se encontraron en duodeno que tenía la mucosa marcadamente edematosa, hiperémica y con múltiples pliegues de aspecto

cerebroide; el contenido era muco catarral con miríada de larvas de *Paramphistomum* spp. de color blanco o rosado, de 1-2 mm de largo. (Archivo Veterinario del Este 2010, 2011)

Este patrón indicaría que se trata de una parasitosis en plena expansión, siendo probable que su importancia este siendo subestimada (Paiva 1994).

Taxonomía

El parásito pertenece al Phylum Plathelminths (cuerpo aplanado en sentido dorso ventral, simetría bilateral), Subphylum Cercomeria, Superclase Cercomeridea, Clase Trematoda (sin divisiones o segmentos), Subclase Digenea (por tener dos ciclos reproductivos), Orden Paramphistomiformes, Suborden Paramphistomata, Superfamilia Paramphistomoidea, Familia Paramphistomidae (forma cónica), Subfamilia Paramphistominae, Género *Paramphistomum* spp. (Travassos y cols., 1969)

Morfología

El género *Paramphistomum* comprende trematodos de cuerpo poco aplanado, moderadamente pequeños, cónicos, ovales, piriformes.

Los parásitos adultos miden 5 -13 mm de largo y 2 - 5 mm de ancho. En el extremo posterior, el acetábulo o ventosa ventral posee un marcado desarrollo muscular que le permite fijarse a la pared ruminal. Una pequeña ventosa oral en el extremo anterior rodea la boca

Carece de aparato circulatorio y respiratorio. Sin embargo tiene muy desarrollado el aparato muscular y los órganos reproductores.

Los testículos son bilobulados y se sitúan en posición posterior diagonal u horizontal. El ovario está en lugar medio o submedio delante o detrás de los testículos. La abertura genital se encuentra en el primer tercio del cuerpo, a veces sin ventosa.

El cuerpo está recubierto por un tegumento espinoso con papilas distribuidas por todo el cuerpo. El aparato digestivo carece de ano, pero posee un poro excretor, el cual es la apertura del ciego y empieza con una abertura oral. El aparato excretor presenta simetría bilateral y es de tipo protonefridial. Existen células flamígeras situadas al final de los tubulos colectores, los cuales desembocan en dos conductos excretores que vierten en una vesícula excretora que se abre al exterior mediante un nefridioporo. Este se sitúa en el extremo posterior del cuerpo.

La ultraestructura e histoquímica del tracto digestivo y sistema linfático y protonefridial de las fases juveniles, así como los tipos y desarrollo de la faringe y esófago son determinantes para la caracterización morfológica específica.

Los parásitos adultos poseen un sistema nervioso central compuesto por dos agrupaciones ganglionares (ganglios) cerebroides situados a ambos lados de la faringe y unidas entre si. Tres pares de cordones longitudinales nacen en dicha unión. Además existe una serie de plexos nerviosos que inervan los distintos órganos (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Los huevos miden 112-175 micras por 74-100 micras, presentan una célula embrionaria de posición central, un opérculo, y un característico color gris plateado, (Paiva 1994).

Se han identificado asertivamente dos especies de *Paramphistomum* en Uruguay: *P. cervi* y *P. ichikawai* (Freyre, 1987), aunque también se ha mencionado la existencia de al menos una tercera especie, *P. leydeni* (Paiva 1994), y se presenta como altamente probable la existencia de otras especies (Freyre, 1987).

Epidemiología

Para la presentación de paramfistomiasis debe coincidir la presencia de los hospedadores intermediario y definitivo, junto a condiciones medioambientales de temperatura y humedad adecuadas, las cuales influyen en el desarrollo de miracidios y multiplicación de caracoles.

La capacidad de adaptación del hospedador intermediario a variaciones ecológicas, también condiciona la aparición de enfermedad. Algunos géneros de planórbidos (como *Bullinus*, presente en África o *Biomphalaria* en América y África), se desarrollan en aguas con baja circulación y salinidad moderada.

La enfermedad siempre se asocia a campos arroceros, pero el laboratorio Regional Este (DILAVE – Uruguay), diagnosticó que también se puede presentar en campos bajos o altos en los que haya presente depósitos de agua, los que al empastarse se transformen en excelente hábitat para los caracoles (Paiva 1994).

El patrón epizootológico para la aparición de casos clínicos en diferentes países tiende a repetirse durante los meses más secos (Boray, 1959), lo cual puede ser explicado teniendo en cuenta varios factores. En primer lugar, en los meses cálidos y lluviosos los caracoles se reproducen y se infectan con miracidios con facilidad, además de que se hallan en mayor número caracoles inmaduros, que son más susceptibles a la infección (Horak, 1967). Así, con temperatura y humedad apropiadas, el ciclo se realiza en un período corto, los caracoles se dispersan con mayor facilidad y se halla menor cantidad de metacercarias por unidad de superficie. Con abundancia de vegetación, los animales solo se acercan a áreas húmedas cuando necesitan beber. Este conjunto de factores redundan en una “dilución” de organismos infectantes con producción de cuadros leves y asintomáticos y en muchos casos generando así una suerte de “inmunización” en los animales expuestos.

En los meses secos, el pasto verde crece solo en los bajos, rodeando las zonas donde los animales beben y zonas más anegadizas, así, las poblaciones de caracoles se ven concentradas a sectores de menor superficie y la probabilidad de ingestión de metacercarias se multiplica varias veces (Horak, 1967).

Sanabria, en Argentina, dice “durante los meses fríos, los caracoles se entierran y disminuyen su actividad manteniéndose como reserva de cercarias. Cuando regresa el tiempo cálido, se reinicia el ciclo y la multiplicación del parásito en los caracoles” No queda claro si se refiere a caracoles planorbidos o a caracoles lymneidos. (Sanabria 2007).

En Uruguay, Malffato y cols. (1982) comentan que la enfermedad se presenta a fines del verano y principios de otoño.

Entre fines de primavera a principios del verano, se inicia la mayor liberación de cercarias, y aunque inicialmente pueda no presentar mayor riesgo para los animales,

la acumulación progresiva de metacercarias podría incrementar las tasas de infección conforme la temporada avanza. Así los cuadros clínicos pueden aparecer entre 2 y 4 meses después, aproximadamente entre mediados y fines de otoño (Sanabria 2007).

Los caracoles planórbidos (hospedadores intermediarios) son acuáticos. Tienen mayor capacidad de adaptación y ocupan hábitat mas diversos que los del género *Lymnaea* spp. (Radostits y cols., 2002).

El desarrollo del caracol se ve afectado por debajo de los 15°C, la capacidad que tienen estos caracoles para estivar es un factor muy importante en la epidemiología, ya que una vez que vuelvan las condiciones óptimas ambientales comienzan inmediatamente su desarrollo y reproducción (Paiva1994).

Un punto importante en la epidemiología son las metacercarias (forma infectante para el hospedador definitivo), éstas pueden sobrevivir por largos períodos en pasturas húmedas próximo a tajamares, represas, canales de agua o campos inundados por el cultivo de arroz (Paiva 1994).

Es una enfermedad que puede afectar a vacunos y ovinos, así como especies silvestres (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002) siendo más susceptibles animales jóvenes que pastorean en pasturas previamente contaminadas por adultos, ya que los animales adultos presentan resistencia pero continúan eliminando huevos (Paiva 1994).

El conocimiento de la epidemiología lleva a establecer y optimizar las medidas de manejo y de control, tales como dosificaciones estratégicas y pastoreos oportunos con categorías susceptibles y resistentes si las hubiere.

Ciclo biológico

Los ruminantes se infectan por vía oral al ingerir la forma quística de los Paramphistomidae, denominada metacercaria. En el duodeno se desenquistan, fijándose en la submucosa, donde generan inflamación y edema. Migran al rumen donde alcanzan la madurez sexual e inician la liberación de huevos, los que salen del hospedador a través de las heces (Guzmán y Hernández., 1992).

Paramphistomum spp. presenta un ciclo de vida complejo, puesto que el parásito pasa por varios estadios de desarrollo que se cumplen en diferentes especies hospedadoras.

Los huevos proceden de la reproducción sexual de los parásitos adultos y su desarrollo embrionario se inicia cuando caen en un ambiente húmedo; en uno de sus extremos poseen un opérculo, por el que sale el miracidio luego de 14 a 16 días.

Este es el estadio larvario más joven. Su cuerpo ciliado facilita el desplazamiento en el agua, hasta encontrar el caracol hospedador. Cuando encuentra al molusco entra por su cavidad respiratoria y a través de la epidermis; si no logra colonizarlo antes de las 4 horas, muere en un período de 24 horas.

En el caracol, el miracidio se transforma en esporocisto y se ubica en el hepatopáncreas del molusco. Los esporocistos son semejantes a un saco con células germinales y presentan un poro de nacimiento por donde emergen generaciones subsecuentes de redías que son observadas a los 14 días aproximadamente, éstas miden 1,2 x 0,5 mm de tamaño, las cuales migran a través de la hemolinfa y órganos del caracol. Éstas se liberan y forman redias hijas a los 20 a 28 días aproximadamente (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002; Paiva, 1994)

Las redias producen cercarias. Las redias de segunda, tercera y cuarta generación continúan el mismo camino que las de primera generación y prosiguen difundiendo cercarias por alrededor de un año (Paiva 1994).

Las cercarias tienen el cuerpo pigmentado y opaco, poseen dos órganos fotorreceptores (manchas oculares). Estas tienen fototropismo positivo al amarillo fosforescente. Presentan una cola más larga que el cuerpo la cual le sirve para propulsarse fuera del caracol. Salen del caracol 43 a 48 días después de la exposición al miracidio y, cuando lo hacen, nadan hacia la superficie del agua. La cercaria pierde la cola al entrar en contacto con una superficie, como hojas, tallos y raíces de plantas, en las que se adhiere; se cubre de capas hasta transformarse en un quiste denominado metacercaria (Lopez, y cols., 2008) Ésta es la forma infectante para los mamíferos, que se caracteriza por su resistencia a las condiciones ambientales hasta 12 semanas, y miden unas 250µm (Dinnik y Dinnik 1954).

Los rumiantes se infectan al ingerir plantas contaminadas con metacercarias, éstas se desenquistan en el duodeno, fijándose durante algún tiempo a la mucosa sin producir alteraciones en casos de infecciones débiles. En infecciones masivas el desarrollo de la larva se retarda, pudiendo permanecer en el duodeno durante meses, lo cual prolonga el curso de la enfermedad (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002). El proceso irrita las mucosas, desencadenando una descamación que obliga a los parásitos a penetrar en la submucosa, en donde generan inflamación y edema. A partir de la 6-8 semana regresan al abomaso y posteriormente al rumen, donde se asientan definitivamente entre las papilas para madurar sexualmente 3-4 semanas después y se observan como gránulos de forma cónica y color rojizo. Esta etapa en el ciclo de vida de los parásitos se caracteriza por la liberación de huevos, los cuales salen del hospedador a través de las heces (Guzmán, Hernández, 1992).

El período pre-patente medio para las diversas especies se ha estimado entre los 96-130 días para bovinos y 96-107 días para rumiantes menores. La vida media en los hospedadores definitivos puede prolongarse hasta los 4 años. (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Infecciones previas en animales adultos provocan un grado de inmunidad capaz de proteger contra infecciones posteriores. Esta inmunidad es parcial en rumiantes menores y completa en ganado vacuno. Factores que influyen en la inmunidad son entre otros, número de metacercarias ingeridas, así como la presencia de vermes adultos en el rumen independientemente del número de los mismos (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Patogenia, Lesiones y Signos clínicos

La enfermedad clínica aparece dependiendo de la susceptibilidad del hospedador y sólo cuando hay enormes cantidades de parásitos inmaduros en duodeno y abomaso, los que migran produciendo una enteritis aguda (Cruz, 2001).

Una vez que las larvas se desenquistan, se fijan a la mucosa penetrando en la pared. Este proceso origina la estrangulación de pequeñas secciones de la mucosa provocando hemorragias, necrosis y erosión de las vellosidades; las lesiones que quedan una vez que el parásito se desprende son del diámetro del acetábulo, se expone de esta manera el estrato vascular, produciendo un aumento de la función

secretora y reducción de la capacidad de absorción perdiendo de esta manera electrolitos y proteínas (Sanabria, 2007). Este conjunto de lesiones causa trastornos intestinales con pérdida de apetito, que puede llegar a la anorexia completa, que junto a la enteritis aguda y pérdida del estado corporal lleva a la caquexia y muerte del animal (Paiva, 1994).

La mayoría de los casos clínicos cursa con disminución de la proteína plasmática y calcio ligado a la albúmina, caída de la volemia, aumento del hematocrito y leucopenia. A causa de la disminución de las proteínas se produce edemas generalizados los cuales se manifiestan como hidrotórax, ascitis, hidropericardio, edema de mesenterio, edema submandibular y edema pulmonar siendo éste causa de muerte (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002; Paiva 1994).

La paramfistomiasis aguda generalmente se presenta en animales jóvenes menores de 2 años de edad, la misma se caracteriza por apatía, diarrea fétida y profusa (a veces de tipo proyectil o en arco), que se desarrolla de 2 a 4 semanas después de la infección (De Waal, 2010).

Los animales beben agua frecuentemente adoptando una postura con el hocico sumergido durante largos períodos de tiempo a consecuencia de una grave deshidratación. En los animales adultos hay una disminución de la producción, fundamentalmente la láctea. Los trastornos clínicos generados por los vermes adultos fijados a la mucosa del rumen son de curso crónico, produciendo hiperqueratosis del rumen, anemia, pérdida de peso y baja en la producción, siendo estos signos de menor intensidad que los originados por las fases juveniles emigrantes (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se basa en una anamnesis de los antecedentes epidemiológicos locales y en los signos clínicos.

La presencia de hospedadores intermediarios en pastos y aguas será un importante factor de sospecha (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

El diagnóstico coprológico nos permite detectar la presencia de huevos, y a la necropsia podemos observar la existencia del parásito y así poder establecer un diagnóstico definitivo.

Diagnóstico clínico

Las primeras manifestaciones clínicas aparecen a las dos semanas de la infección. Lo que se puede observar es una diarrea fétida y profusa, anorexia, importante pérdida de peso e incluso muerte, todo esto producido por la migración del parásito. En los animales adultos disminuye la producción, especialmente la láctea (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Los trastornos clínicos provocados por los vermes adultos de este parásito fijados en la mucosa del rumen son menores que los originados por las fases juveniles (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Diagnóstico coprológico

La detección de huevos de *Paramphistomum spp.* se puede realizar por técnicas de sedimentación (Happich&Boray o sedimentación simple) al igual que las usadas para *F. hepatica*. Los huevos presentan una célula embrionada de posición central, el opérculo y su característico color gris plateado, miden entre 112-175 μm por 74-100 μm (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002; Paiva, 1994; Sanabria, 2007). El hallazgo de huevos en las materias fecales solo indica la presencia de vermes adultos, no de formas inmaduras.

Ocasionalmente pueden observarse las larvas en la materia fecal. Para poderlas visualizar es necesario coleccionar aproximadamente 10 gr. de heces diarreicas y dejar sedimentar en 100 - 200 ml. de agua durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se repite la operación, el sedimento se coloca sobre una superficie oscura para su observación. Las larvas se observan como pequeños granos de arroz de color rosado (Paiva, 1994).

Otras pruebas

Se han empleado diferentes pruebas serológicas. Extractos antigénicos de gusanos adultos e inmaduros y de metacercarias, pueden emplearse en pruebas intradérmicas. También se ha usado la fijación del complemento y pruebas de precipitación alrededor de parásitos vivos. Últimamente la inmunofluorescencia y el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), empleando como antígeno extracto de vermes adultos, ofrecen resultados aceptables (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Diagnóstico diferencial

Es importante establecer el diagnóstico diferencial fundamentalmente con fasciolosis. Los resultados de la coprología podrían inducir a error por la similitud de los huevos de ambos trematodos. Por todo ello, la interpretación de lesiones y sobre todo el hallazgo de los trematodos durante la necropsia resultan ser definitivos (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Prevención y Control

El control debe integrar las acciones quimioterapéuticas con la prevención de la entrada de los animales a los lugares poblados por hospederos intermediarios, especialmente en las épocas que determinan los patrones locales de transmisión, lo que se puede conseguir con el establecimiento de simples barreras mecánicas o rotación de pasto (Dirksen y cols., 2005).

El conocimiento epidemiológico de la enfermedad, conduce a la utilización estratégica de drogas, así como a un manejo pastoril oportuno de las categorías susceptibles (Paiva, 1994).

Tratamiento

El tratamiento eficaz frente a los parafistomos en el ganado vacuno exige su diagnóstico preciso y precoz. Existen muy pocos productos eficaces frente a los trematodos Paramphistomidae. Hace algunos años se postuló el empleo de antihelmínticos como el nitroxynil, pero hoy en día el fármaco de elección es la oxyclozanida, que presenta una excelente actividad sobre estos parásitos (Paz Silva, 2006).

La quimioterapia se dirige por un lado al tratamiento contra los gusanos adultos localizados en el rumen y, por otro lado, a la actuación contra brotes agudos de la enfermedad ocasionados por los vermes jóvenes (Muro Alvarez y Ramajo Martín, 2002).

Los fármacos más empleados, así como su indicación se exponen en el cuadro I:

Cuadro I, "Drogas de acción parafistomicida"

	Vermes inmaduros (rumiantes menores)	Vermes inmaduros (bovinos)	Vermes maduros (rumiantes)
Hexacloroetano			X
Hexaclorofeno			X
Hexacloroparaxileno			X
Bitionol	X	X	X
Bitionolsulfoxido	?	?	X
Niclofoian	X		
Niclosamida	X	X	
Oxiclozanida sola o con levamisol	X	X	X
Resorantel	X	X	X
Rafoxanide	X		
Brotianide	?	X	X

Fuente: Cordero del Campillo M y Rojo FA, 2002

Importancia de la enfermedad

Según la OMS es una parasitosis emergente.

Es de distribución mundial, pero de escasa importancia veterinaria, excepto la forma intestinal aguda que es importante en áreas de clima tropical y subtropical (Kassai, 2002).

Atendiendo a la definición de la OMS, se trata de una enfermedad emergente puesto que se ha incrementado el conocimiento de su extensión, en los últimos años se ha diagnosticado en diferentes países europeos como Italia, Francia o España, y americanos como México o Argentina, donde además se ha comprobado que la prevalencia de paramfistomosis ha aumentado en los últimos años, obteniéndose porcentajes que oscilan entre el 11% y el 40%. Es necesario destacar que en Francia, durante el periodo 1990-1999, la prevalencia de paramfistomosis pasó del 5,2% al 44,7% (Paz Silva, 2006).

Se han descrito varias especies de trematodos Paramphistomidae, entre los que destacan los géneros *Paramphistomum* (*P. cervi*, *P. ichikawi*, o *P. microbothrium*), *Cotylophoron*, *Gigantocotyle* y *Calicophoron*. La especie más habitual en Europa es *Calicophoron daubneyi*, que en España se ha descrito en el noroeste (Díaz y cols., 2006).

En México, se reportaron infestaciones experimentales de *Paramphistomum cervi* en 3 de las 5 especies de caracoles del género *Lymnaea* presentes en ese país (Castro-Trejo L, 1990). Los autores mencionan la baja ocurrencia de parasitosis en oveja (Quiroz y Ochoa, 1972) y en ganado. También se hace referencia a que durante 1965, se atribuyeron 64 muertes de vacunos en Sudáfrica a *Paramphistomum* (Horak, 1967) (Castro-Trejo L., 1990).

La paramfistomiasis es una parasitosis poco estudiada y durante los últimos años su presentación se ha visto incrementada en diferentes países europeos y en América Latina (Rodríguez Izaguirre, 2011).

OBJETIVOS

Objetivo general

Reproducir experimentalmente el ciclo biológico de *Paramphistomum* spp.

Objetivos específicos

Confirmar el período prepatente de *Paramphistomum* spp.

Identificar la o las especies de caracoles planorbideos actuantes como hospedadores intermediarios.

Estimar el potencial biótico del parásito.



MATERIALES Y METODOS

Obtención de caracoles infectados naturalmente

Para la recolección de caracoles se concurre a dos establecimientos rurales en el departamento de Rocha:

Establecimiento 1 - Estancia "El Ceibo" del Sr. Juan Verdier ubicado en la 6ª seccional policial, 33° 30' latitud Sur, 53° 45' longitud Oeste, a una distancia de 53 Km. de la ciudad Lascano y a 67 Km. del pueblo Cebollatí. Consta de una superficie total de 1320 há de pastoreo compuesta por campo natural, nunca fue arada para el cultivo de arroz. Son campos bajos, anegadizos, de bañado. Es una explotación que se dedica a la cría, el productor compra terneros y los cría para su posterior venta. Desde el año 2009 el productor envía materia fecal de los vacunos al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria para la realización de análisis coproparasitarios como base de un programa de control parasitario. En base a estos datos ha sido comprobada la presencia de *Paramphistomum* spp.

Establecimiento 2 - "La Pantanosa" del Dr. Miguel Riet Correa, ubicado en la décima seccional policial, 34° 27' latitud Sur, 54° 20' longitud Oeste, a 4 Km. de la ciudad de Rocha. Consta de una superficie de 260 há de campo mejorado, dedicado a la invernada de ganado vacuno. No tiene antecedentes de infección por trematodos, por lo que no se sabe su estatus sanitario a este respecto.

La recolección de caracoles se realizó con tamices en los lugares anegados y con pasto y luego éstos fueron acondicionados en recipientes debidamente rotulados y transportados al Laboratorio de Parasitología.

Este procedimiento se realizó en cuatro oportunidades diferentes y en épocas diferentes del año en el Establecimiento 1:

- Primera recolección 13 de febrero de 2010.
- Segunda recolección 12 de marzo de 2010
- Tercera recolección 28 de agosto de 2010
- Cuarta recolección 18 de setiembre de 2010

Al establecimiento 2 se concurre una vez, el 3 de Abril de 2011.

Una vez en el laboratorio, los ejemplares colectados se clasificaron y separaron genéricamente bajo lupa binocular en base a la descripción realizada por Paraense (1975).

Una vez descartados los ejemplares muertos, los caracoles vivos se dividieron en 7 recipientes, de manera de poder revisar un recipiente por día. Así, cada caracol fue revisado una vez por semana durante 6 semanas para comprobar la presencia de infección por redías/cercarias. Al no comprobarse infección el ejemplar volvía al recipiente original. Si algún individuo presentaba infección, se lo separaba en cajas de petri individualmente colocándole en la misma papel plástico amarillo y se le observaba diariamente para determinar salida de cercarias o enquistamiento de las mismas en el papel.

Los caracoles positivos se mantuvieron de la manera anteriormente mencionada hasta que no se pudo evidenciar más metacercarias. Las metacercarias obtenidas enquistadas en el papel se mantuvieron en recipientes con agua y en heladera a 4°C hasta su posterior utilización para infección artificial.

Obtención de caracoles para infección artificial

Los caracoles que no manifestaron infección al cabo de 6 semanas de observación se los consideró "libre de infección" y se los mantuvo en condiciones ambientales similares a las de su hábitat, realizando el mantenimiento adecuado, como el cambio del agua, proporcionándole alimento y realizando la inspección mediante microscopía de la vitalidad observando el movimiento de su corazón, desechando así los que iban muriendo.

A los que lograban sobrevivir se los midió descartando los ejemplares cuyo diámetro fuera menor a 4mm y mayor a 7mm para el género *Drepanotrema*, y a los mayores de 12mm para el género *Biomphalaria*. Finalmente se obtuvieron 135 ejemplares del género *Drepanotrema* y 15 del género *Biomphalaria* que fueron acondicionados de a 5 ejemplares en cada una de 30 cajas de Petri.

Este procedimiento se repitió en cada una de las cinco recolecciones de caracoles. A la última recolección se le agregaron 10 ejemplares de *Lymnea viator* y 5 de *L.columella* cedidos por el Lic. Oscar Castro.

Obtención de *Paramphistomum* adultos y huevos

Para obtener huevos de *Paramphistomum* spp. se realizaron salidas a frigorífico con el fin de extraer ejemplares adultos del parásito desde el rumen de animales faenados.

Se concurrió al Frigorífico Carrasco en el Departamento de Canelones los días 15 de Marzo y 9 de abril de 2010 y 9 de mayo de 2011, y al Frigorífico Copayan ubicado en el Departamento de Rocha, los días 30 de Setiembre y 20 de octubre de 2010. En la sección "mondonguería", a donde llegaban los rúmenes de los bovinos faenados, se recogieron ejemplares vivos de *Paramphistomum* spp. adultos. Estos se obtenían con pinzas de disección desde la mucosa del rumen donde estaban adheridos en grupos. Luego fueron colocados en recipientes plásticos de 100 ml de capacidad con tapa rosca con suero fisiológico tibio a una temperatura de 32°C. Estos recipientes fueron colocados en cajas conservadoras para su traslado hasta el laboratorio de parasitología.

Una vez en el laboratorio se procedió al lavado de los ejemplares con solución fisiológica tibia por sedimentación y extracción de sobrenadante. Cincuenta parásitos fueron colocados de a 10 ejemplares mayores de 10 mm en cada uno de 5 tubos de centrifuga de 50 ml de capacidad y colocados en estufa a 32°C durante 24 hs. para que se produzca el desove.

El resto de los ejemplares fueron divididos en cinco frascos plásticos con tapa rosca de 100 ml de capacidad y colocados en estufa a 32°C. durante 24 hs con el mismo propósito.

Con el fin de determinar la especie de *Paramphistomum* spp fueron llevados a la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria, 50 ejemplares acondicionados en formol en un frasco de 100 ml para realizar cortes histológicos.

Obtención de miracidios

Una vez transcurridas las 24 hs de incubación de los ejemplares generales en los frascos de 100ml se retiraron los parásitos adultos mediante filtración y los huevos obtenidos de esta manera se repartieron en 5 frascos de 100 ml que fueron envueltos en papel aluminio (para evitar la luz directa y prevenir la eclosión prematura de algunos miracidios) y colocados en estufa a 26°C durante 14 días.

Transcurrido ese tiempo los frascos se desarrollaron y destaparon; el contenido fue vertido en cajas de Petri y éstas expuestas a la luz directa para estimular la eclosión de los miracidios.

Infección de los caracoles

Para cada una de las cinco recolecciones se realizaron tres procedimientos de infección diferentes.

En la primera y segunda oportunidad se infectaron 150 caracoles previamente distribuidos en 30 cajas de petri con 10 miracidios por caja. Estos eran obtenidos mediante pipeteado directamente desde las cajas donde habían sido cultivados y eclosionados.

En la tercera oportunidad se infectaron 150 caracoles previamente distribuidos uniformemente en 30 cajas de petri. En este caso la infección de los caracoles se realizó con diferentes cantidades de miracidios por caja distribuidas de la siguiente manera:

- 6 cajas con 10 miracidios cada una
- 6 cajas con 20 miracidios cada una
- 6 cajas con 30 miracidios cada una
- 6 cajas con 40 miracidios cada una
- 6 cajas con infección masiva

En la cuarta y quinta oportunidad los 150 caracoles fueron infectados en forma masiva.

Los 10 ejemplares de *Lymnaea viator* fueron distribuidos en 2 cajas de 5 ejemplares cada una y los 5 ejemplares de *L.columnella* se colocaron en una caja de Petri. A cada una de las 3 cajas se le agregó 25 miracidios de manera de intentar producir una infección controlada.

En cada una de las cinco oportunidades las cajas fueron observadas bajo lupa durante las primeras 3 hs. post infección. Las cajas se mantuvieron durante 45 días a temperatura de laboratorio, renovando el agua día por medio y alimentando los caracoles diariamente; semanalmente se le agregaba conchilla molida de caracol como fuente de calcio.

Desde los 10 días post infección y hasta los 45 días se observaban diariamente en busca de elementos que evidenciaran que algún caracol estuviera infectado.

Infección de hospedero definitivo

Para la realización de esta tesis se consto con la aprobación previa de la comisión de bio ética.

Un ovino macho cruce Corriedale, diente de leche, procedente del campo experimental N° 1, Migues, de la Facultad de Veterinaria fue alojado en un box del laboratorio N° 3 de Parasitología, alimentado con fardo de alfalfa y agua ad libitum.

En el campo experimental N°1, Migues, de la Facultad de Veterinaria no se ha comprobado la presencia de Trematodos en rumiantes.

Al ingresar se le realizó un examen coprológico por técnica de Mc.Master para la cuantificación de huevos fecales (HPG) y se le administró un antihelmíntico de amplio espectro (levamisol, Ripercol, ®, Fort Dodge).

El animal se mantuvo en estas condiciones durante un mes.

Previo a la infección también se le realizó análisis coprológico por técnica de sedimentación de Happich y Boray para comprobar que estuviera libre de trematodos adultos.

Posteriormente se procedió a la infección del ovino con 118 metacercarias obtenidas de caracoles infectados naturalmente, mediante el uso de una sonda esofágica.

Cincuenta días post-infección se comenzó la recolección de materia fecal mediante extracción desde el recto para realizar la técnica de sedimentación de Happich y Boray cada 48-72 horas, a partir del día 90 se comenzó a realizar la técnica diariamente hasta el día 110.

Estimación del potencial biótico de *Paramphistomum* spp.

Para estimar el potencial biótico, se utilizaron los 50 ejemplares que medían más de 10 mm, se distribuyeron en 5 tubos (cada tubo con 10 *Paramphistomum* spp.) y se incubaron por 24 hs. a 26 °C.

El contenido de los tubos se filtró para extraer los parásitos adultos y el filtrado de cada uno se dejó sedimentar durante 20 minutos en los mismos tubos de centrifuga con un volumen final de 50 ml. Posteriormente se homogeneizó el contenido de cada tubo y se extrajeron 5 ml que fueron reconstituidos en otro tubo con 50 ml de agua destilada. De esta dilución se extrajeron 5 ml para cuantificar huevos. Este procedimiento se realizó por dos veces. La estimación del potencial biótico para cada alícuota (PBa) se realizó de la siguiente forma:

- $PBa = N^{\circ} \text{ de huevos} \times 100 / 10$

Esto se realizó para cada una de las dos alícuotas de cada uno de los cinco tubos. Para cada tubo se calculó el promedio del potencial biótico (PBt).

El potencial biótico final se calculó promediando los cinco PBt.

RESULTADOS



Caracoles infectados naturalmente

Solo se obtuvieron caracoles infectados naturalmente en la segunda recolección que fue realizada en el mes de Marzo.

En la primera salida (13/2/10) se recolectaron 400 caracoles. Durante los siguientes 3 días se descartaron 73 caracoles (22.3% de mortalidad) por no presentar actividad cardíaca o movimiento del manto. De los 327 caracoles restantes, hasta el día 45 sobrevivieron 187 ejemplares (57,2% de sobrevivida). En ninguno de ellos se registró infección natural. Aproximadamente la mitad de los ejemplares muertos durante los 45 días de mantenimiento fueron aplastados para intentar evidenciar infección por estados larvarios precoces, sin embargo no se evidenció infección en ninguno de ellos.

De los 2140 caracoles recolectados en la segunda salida de campo (12/3/10) sobrevivieron 1428 ejemplares al día 3 (33% de mortalidad). Luego de haber separado y eliminado los caracoles muertos, los sobrevivientes se mantuvieron como fue descrito en Materiales y métodos. En el día 26 de marzo, durante una inspección de rutina, se encontraron metacercarias enquistadas en las paredes de dos de las cajas de Petri. Cuando se observaron los caracoles individualmente se encontraron dos ejemplares con presencia de cercarias migrando en su interior.

Estos caracoles infectados pertenecían al género *Drepanotrema* spp. Se intentó entonces determinar la especie de los mismos, llegándose a que probablemente pertenecieran a la especie *D. depressissimum*. Los caracoles fueron separados individualmente en cajas de Petri y se les colocó papel plástico amarillo colocándolos a partir de ese momento en estufa a 26 °C durante la noche. Durante el día se les agregaba agua fría para estimular la emergencia de las cercarias. Los papeles plásticos con las metacercarias se retiraron a diario y fueron mantenidos en recipientes con agua en heladera. Este procedimiento se repitió durante 20 días al cabo de los cuales se lograron obtener 118 metacercarias.

Entre el día 20 (15/4/10) y el 25 (20/4/10) ya no se obtuvieron más metacercarias y los caracoles fueron aplastados para determinar si aún quedaba infección residual por algún otro estadio que no fuera visualizado bajo lupa y por transparencia. No se encontraron estadios parasitarios de ningún tipo. De los 1426 caracoles restantes al día 45 sobrevivieron 898 ejemplares (63 %). Estos dos caracoles infectados naturalmente representaron el 0,14% del total de caracoles vivos al día tres.

En la tercera salida de campo realizada el 28/8/10 se recolectaron 2054 caracoles de los cuales murieron al los tres días 546 (26,5%). Los 1508 caracoles restantes fueron mantenidos y lograron alcanzar los 45 días de incubación 935 caracoles (62%). No se registraron ejemplares con infección natural, tanto en los sobrevivientes como en los muertos durante el proceso.

De los 400 caracoles recolectados en la cuarta salida de campo el 18/9/10, sobrevivieron 307 (23,25% de mortalidad) que luego de ser mantenidos y examinados durante 45 días no presentaron signos de infección natural. En el proceso murieron 144 caracoles (47%).

En la visita al segundo establecimiento (3/4/11) se recolectaron 225 caracoles de los que murieron 38 (17%). De los 187 sobrevivientes al día 45 no se obtuvieron signos de infección. Aquí murieron 84 caracoles (45%). Estos datos se muestran resumidos en el cuadro II:

Cuadro II, "Recolección de caracoles en las cinco salidas"

Nº de salida	Fecha	Nº de recolectados	Nº de sobrevivientes al día 3	% de sobrevivientes al día 3	Nº de sobrevivientes al día 45	% de sobrevivientes al día 45	Nº infectados naturalmente
1	13/02/2010	400	327	77,7	187	57,2	0
2	12/03/2010	2140	1428	67	898	63	2
3	28/08/2010	2054	1508	73,5	935	62	0
4	18/09/2010	400	307	76,75	163	53	0
5	03/04/2011	225	187	83	103	55	0

Infección artificial de caracoles

Ninguno de los 675 caracoles del género *Drepanotrema*, 75 caracoles del género *Biomphalaria*, 10 caracoles de la especie *Lymnaea viator* y 5 de la especie *Lymnaea columella* resultó infectado en ninguna de las cinco oportunidades en que se enfrentaron a los miracidios, independientemente del número de formas infectantes a las que fueron expuestos. Los miracidios se desplazaron de forma normal, llegando incluso a tocar los caracoles, pero nunca pudo evidenciarse penetración. Los caracoles estaban en buenas condiciones y se movieron normalmente durante la fase de exposición y no parecieron alterar su comportamiento cuando fueron enfrentados a los miracidios. Desde el día 10 pos - exposición y hasta el día 45 los caracoles fueron revisados diariamente y nunca pudo observarse algún estado larvario de *Paramphistomum* dentro de los ejemplares. Tampoco eliminaron cercarias inadvertidamente, puesto que hubieran enquistado en los papeles plásticos amarillos o en las paredes de los recipientes, y esto nunca fue observado.

Estimación del potencial biótico

Los resultados individuales y los promedios se expresan en la tabla adjunta. Se determinó un mínimo de 190 huevos de *Paramphistomum* en el tubo número dos y un máximo de 1650 huevos en el tubo número cinco, con un promedio de 899 huevos por parásito.

No hubo diferencia en el conteo de huevos entre las alícuotas de cada tubo aunque sí hubo diferencia en el promedio entre los tubos.

Comparando el promedio de cada uno de los tubos, en el grupo 2 tenemos una diferencia notoria entre este grupo y los restantes. En los grupos 1-3-4-5 las diferencias son poco evidentes entre sí. Los resultados se detallan en el cuadro II:

Cuadro III, "Estimación del potencial biótico"

Grupos	Paramphistomum	Número		Promedio	Dilución
		Huevos Totales	Huevos por <i>Paramphistomum</i>		
1	10	7300	730	710	1:100
		6900	690		
2	10	1900	190	235	1:100
		2800	280		
3	10	11700	1170	1160	1:100
		11500	1150		
4	10	8500	850	770	1:100
		6900	690		
5	10	15900	1590	1620	1:100
		16500	1650		
Potencial biótico		899			

Infección de hospedero definitivo

Las 118 metacercarias obtenidas de los caracoles infectados naturalmente, recolectados en el mes de marzo, que fueron mantenidas y acondicionadas en condiciones de laboratorio como anteriormente se mencionó, fueron administradas vía oral mediante sonda esofágica a un ovino macho, cruzo Corriedale, categoría diente de leche.

A partir del día 50 post infección, se procedió a la extracción desde el recto de materia fecal para análisis coprológico mediante técnica de Happich & Boray.

Entre los días 50 y 90 post infección se hicieron muestreos de materia fecal cada 48 horas y a partir del día 90 hasta 109 los muestreos eran cada 24 hs.

Cumplido el periodo pre-patente del parásito (96-107 días) se realizaron tres muestreos más los días 120, 130, y 150 post infección.

Todos los análisis realizados en estas fechas dieron un resultado negativo, no pudiendo detectar la presencia de huevos mediante la técnica utilizada.

En ninguna oportunidad post infección se pudieron evidenciar signos clínicos de la enfermedad parasitaria, ni en su etapa aguda como tampoco en la crónica.

Al día 200 post infección se realizó la necropsia del ovino, extrayendo y observando rumen e intestino delgado, confirmando la ausencia de *Paramphistomum* spp.

Obtención de miracidios

Se obtuvieron gran cantidad de miracidios a partir del cultivo de los huevos de *Paramphistomum* spp. recolectados desde frigorífico, aunque estos resultados no fueron homogéneos en las cinco oportunidades. En la primera oportunidad fue donde se obtuvo la mayor cantidad de miracidios eclosionados en relación a la cantidad de huevos sembrados, comparada con las siguientes recolecciones en la cual fue observada una notoria disminución de la eclosión.

Determinación de la especie de *Paramphistomum* spp.

No se pudo llegar a determinar la especie de *Paramphistomum* spp. debido a que los cortes histopatológicos que se realizaron no fueron los adecuados para su identificación y confirmación.

DISCUSIÓN

Caracoles infectados naturalmente

De las recolecciones efectuadas en los meses de febrero, marzo, agosto y setiembre de 2010 y abril de 2011, solo se obtuvieron dos ejemplares naturalmente infectados, de más de 3700 individuos que llegaron vivos al día 45 luego de la recolección. Estos dos ejemplares se recogieron en el mes de marzo en el establecimiento 1. Este bajo número de caracoles naturalmente infectados (0,14 %) puede deberse a las diversas condiciones ambientales de esos meses, como la temperatura, lluvias, estado de vegetación y pastoreo de animales. Estas condiciones pueden influir positiva o negativamente en el ciclo biológico natural del parásito.

Si bien hay varios trabajos que indican porcentajes de infección artificial de caracoles, solo se reportan pocos casos de porcentaje de caracoles infectados naturalmente. Cuando los reportes indican obtención de metacercarias desde caracoles infectados naturalmente, la intención es obtener la forma infectante para realizar infecciones artificiales con el fin de medir otras características del ciclo biológico, o efectos patológicos del parásito en el hospedador, pero no el porcentaje de caracoles infectados. En Brasil, G. Muller (1992) reporta un promedio de infección natural de un 2,28 % en *Drepanotrema kermatoides*, con un mínimo de 0,59% y un máximo de 4,00%. En el trabajo no se especifica la época del año en que se realizó la colecta y se trata de una especie de caracol diferente a la encontrada en nuestro trabajo, sin embargo, el porcentaje de caracoles infectados naturalmente es sensiblemente mayor.

Por otro lado, no hay publicaciones que hayan determinado datos epidemiológicos de las poblaciones de caracoles con respecto a la infección con *Paramphistomum* spp. como sí los hay con respecto a *Lymnaea viator* con *F. hepatica* (Castro, 2001). Un solo reporte de estudio epidemiológico de *Calicophoron daubneyi* en *Galba truncatula* fue realizado en Galicia, España (Iglesias Piñeiro, 2010).

Obtención de miracidios

Los huevos de *Paramphistomum* spp. eclosionaron en su gran mayoría a los 15 días para dar lugar a los miracidios. Otros estudios sobre paramphistomidos determinaron períodos de incubación equivalentes. Grétilat (1959), con huevos *Carmyerius dollfusi*, obtuvo miracidios a los 15 - 18 días a 29-30°C. Dinnik y Dinnik (1960) reportan haber obtenido experimentalmente miracidios de *Carmyerius exoporus* después de 15 días de incubación. Huevos de *Paramphistomum togolense* y *P. daubneyi* han producido miracidios después de 9 a 12 días de incubación y de 12 a 15 días de incubación a 27 °C, respectivamente (Seck y cols., 2006).

El período de incubación encontrado en el presente trabajo no mostró diferencias significativas con respecto a los datos reportados en la bibliografía consultada. Las pequeñas diferencias en la liberación de miracidios están probablemente relacionadas con las especies y las condiciones experimentales, especialmente a la temperatura que fueron incubados los huevos.

Infeción de caracoles

A pesar de haber enfrentado un gran número de caracoles a infección artificial con miracidios de *Paramphistomum* spp. y haberlo intentado con diferentes cantidades de miracidios por caracol y en varias oportunidades, no pudo lograrse efectivamente la infección.

El número de miracidios utilizados en las infecciones parece no haber sido determinante para la infección, ya que en ninguna de las cinco oportunidades que se intentó realizar la infección artificial, ésta se logró.

Ostrowski De Núñez (1977), trabajó con una especie de digenea que no es un paramfistómido y cita que "...la penetración propiamente dicha en el caracol no ha podido ser observada. Se intentó observar la penetración del miracidio bajo lupa binocular en un recipiente pequeño, los miracidios nadaban indiferentes, sin mostrar mayor actividad ni mayor atracción por el caracol, hasta tocaban el molusco, para alejarse nuevamente de él, siendo observado durante unas tres horas, suponiendo que la constante actividad de los caracoles y las condiciones anormales inhibieron la infestación". Este mismo comportamiento fue observado en nuestro trabajo, por lo que la falla en la infección pudo deberse a las mismas causas citadas por la autora.

Por otro lado, Campbell (1961), basándose en los resultados de otros autores, supone que en frascos con pequeña cantidad de agua no se crea el gradiente necesario de las sustancias de atracción para una orientación de los miracidios de modo que solo se observa su activación pero no quimiotaxismo.

Sin embargo, Muller (1992) reporta un promedio de 2,27 % de infección artificial de *Drepanotrema kermatoides* con miracidios de *Paramphistomum* spp. Esta autora realiza infecciones con 3, 4 y 8 miracidios e infección en masa, sobre 66 caracoles por grupo, logrando infección de 0, 2, 1 y 3 caracoles respectivamente. Esto significa entre 0 y 4,5 % de infección. En el mismo trabajo el autor, citando a Dinnik (1954), dice que se obtuvo 1,6 % de infección con *Paramphistomum sukari* en ejemplares de *B. pfeifferi*. De todas maneras, el autor concluye que tanto las infecciones naturales como las artificiales son bajas.

En nuestro trabajo se intentó la infección con 2, 4, 6 y 8 miracidios por caracol e infección en masa, sin éxito. Además, se intentó infectar varias especies de caracoles, entre ellos *Drepanotrema depresissimum*, *D. heloicum*, *Biomphalaria* spp, *Lymnaea viator* y *L. columella*. También es cierto que el porcentaje de infección natural encontrado en el presente estudio fue muy baja, concordante con lo encontrado por otros autores. Tal vez, el desarrollo de la infección natural no necesite de tanto éxito para mantener la infección de un campo y que esta baja tasa de infección se mantenga en condiciones de laboratorio.

Castro (comunicación personal) ha realizado con éxito y en varias oportunidades la infección en laboratorio de *Lymnaea viator* con miracidios de *F. hepatica*, aunque ha fallado repetidas veces al intentar infectar caracoles planorbideos con miracidios de *Paramphistomum* spp. En este sentido, Castro y cols, (2001) encuentra porcentajes máximos de infección natural de *Lymnaea viator* de aproximadamente 4 % en setiembre – Octubre, lo que da lugar a pensar que para este trematodo el porcentaje de infección natural de su hospedador intermediario también es bajo.

Por otro lado, en Uruguay solo hay un reporte de correlación entre especie de *Paramphistomum* spp. y hospedador intermediario citado por Paiva (1994) como comunicación personal de Boray. En este caso se trataba de *Paramphistomum leydeny* y *Drepanotrema anatinum*. También puede suceder que haya alguna

especificidad de hospedador intermediario para cada especie de *Paramphistomum* spp. y que la especie del trematodo utilizada en el presente trabajo no haya sido la apropiada para las especies de caracoles empleadas. Determinar la especie de *Paramphistomum* spp. tampoco es tarea fácil, ya que no existen elementos morfológicos externos concluyentes. Para ello se necesita hacer cortes histológicos, observando y midiendo el diámetro del acetábulo con respecto a la longitud del cuerpo, el tipo y longitud de la faringe, la relación entre la longitud de la faringe y el diámetro del acetábulo, la ubicación de los testículos, ovario y glándula de Mehlis, y el tipo de atrio genital entre otros. En la presente tesis no se pudo determinar la especie de *Paramphistomum* spp. recogidos en frigorífico, puesto que los cortes histológicos realizados no fueron de la calidad necesaria para tal fin, por lo tanto no se determinó la especie a la que pertenecían los miracidios utilizados.

Obtención de las metacercarias para su posterior administración al ovino

Se obtuvieron 118 metacercarias en total, de dos caracoles infectados naturalmente. Estas fueron administradas a un ovino aunque no se pudo conseguir la infección.

Como algunas de las metacercarias se enquistaron en la superficie de las cajas donde estaban los caracoles (y no en los plásticos amarillos puestos a tales efectos), fueron separadas con aguja de disección y almacenadas en agua a 4 °C. El haberlas separado de la superficie en donde habían enquistado, pudo dañarlas y hacerlas perder viabilidad. Sin embargo, Rolfe y cols., (1994), utilizan como metodología de obtención de metacercarias la técnica de Durie modificada. En las peceras donde estaban alojados los caracoles colocan rectángulos de papel plástico amarillo. Durante dos horas en la mañana iluminan la pecera con una lámpara de 60 W y las cercarias se enquistan en los papeles. Las metacercarias enquistadas se separan del plástico utilizando un pincel húmedo y colocadas en agua a 5°C. En ese trabajo los autores no reportan disminución de la viabilidad de las metacercarias por efecto de la manipulación.

Otra posible razón de la falla en la infección pudo haber sido la baja carga de elementos infectantes. En la naturaleza los hospedadores definitivos adquieren la infección paulatinamente al ir ingiriendo cantidades diarias variables de metacercarias, sin embargo en los trabajos de investigación las infecciones siempre son puntuales y con cantidades muy superiores a la utilizada en esta tesis. Así, Seck y cols., (2006) infectan bovinos con 500 metacercarias y Rolfe y cols., (1994) infectan ovinos con 5000 y 40000 metacercarias. Correa y Castro (comunicación personal) intentaron infectar un ovino con 54 metacercarias obtenidas de un caracol naturalmente infectado, sin éxito. Sin embargo estos mismos autores infectan un ovino con 200 metacercarias de *F. hepatica* confirmando la infección con el hallazgo de dos ejemplares adultos en el hígado luego de la necropsia (comunicación personal). En nuestro trabajo se utilizaron 118 metacercarias que fueron todas las que se pudieron obtener.

Seck y cols., (2006) midieron porcentajes de eficacia de infección en bovinos según tiempo de maduración de metacercarias, obteniendo la mayor tasa (83.8%) con metacercarias con cuatro semanas de maduración. El mismo autor cita a Albaret , (1978) obteniendo una tasa de infección en ovinos del 30.67% con metacercarias de *P. microbothrium* de cinco semanas de maduración, y a Sey (1979) que obtuvo en una cabra una tasa de infección del 35,7% utilizando metacercarias de *P. daubneyi*

con dos semanas de maduración. El autor concluye que estas diferencias podrían estar relacionadas con la especie de parásito, el tipo de hospedador definitivo y la edad de maduración de las metacercarias. Nuestro trabajo no tenía como objetivo medir la maduración de metacercarias. Sin embargo, entre las primeras metacercarias obtenidas y las últimas transcurrieron 27 días, con lo cual las 118 metacercarias tuvieron tiempos diferentes de maduración que fueron desde 0 a 4 semanas. Esto pudo haber influido en el intento de infección al disminuir aun más la cantidad de metacercarias con maduración suficiente para lograr continuar el ciclo.

Algunos animales silvestres pueden alojar trematodos anfishomidos que podrían tener como hospedadores intermediarios caracoles planorbideos. Se han registrado en Uruguay trematodos pertenecientes a cuatro familias de paramphistomoides (Paramphistomidae, Balanorchidae, Cladorchiidae, Diplodiscidae). Castro (comunicación personal) encontró en recto de sapos *Catadiscus* spp. (familia Cladorchiidae) que podría tener caracoles planorbideos como hospedadores intermediarios; incluso realiza una infección experimental en renacuajos con cercarias anfishomas trioculadas eliminadas por caracoles de la especie *Drepanotrema depressissimum* obteniendo ejemplares aparentemente de *Catadiscus* spp.

Teniendo esto en cuenta, pudo haber pasado que algunas o todas las metacercarias obtenidas en nuestro trabajo no fueran de *Paramphistomum* spp. y pertenecieran a otro anfishomido parásito de animales silvestres.

Sin embargo, la morfología de las cercarias obtenidas, así como la apariencia de las metacercarias (tamaño, biculadas), eran similares a las descritas en la bibliografía consultada como pertenecientes al género *Paramphistomum* spp.

No hay trabajos que determinen grados de especificidad de especie de *Paramphistomum* spp. con especies de hospedadores definitivos. Sin buscar especificidad los trabajos consultados relacionan *P. ichikawai* en ovinos (Rolfe y cols., 1994), *P. daubneyi* en cabras (Sey, 1979), *P. microbothrium* en bovinos (Seck y cols., 2006) y ovinos (Albaret y cols., 1978) y *P. sukary* en vacunos (Dinnik y Dinnik., 1954).

Al provenir las metacercarias de caracoles naturalmente infectados nos fue imposible determinar la especie, suponiendo que se tratara de *Paramphistomum* spp.

Potencial biótico

En la bibliografía consultada no se encontraron datos que reporten el potencial biótico del *Paramphistomum* spp.

Aunque el cálculo del potencial biótico no era el objetivo primario, éste igualmente se determinó en el momento de manipulación de los *Paramphistomum* spp. en el laboratorio para la obtención de huevos, aunque tal vez no con la suficiente cantidad de ejemplares adultos ni con el conteo de número representativo de alícuotas. Por tal motivo no se hicieron estudios estadísticos que nos pudieran arrojar datos con mayor confiabilidad.

Los valores de potencial biótico obtenidos en cuatro de los cinco grupos formados fueron similares.

Si bien el dato puede ser estadísticamente insuficiente, sienta la base para estudios futuros más específicos.

CONCLUSIONES

No se pudo conseguir totalmente el objetivo principal del trabajo, puesto que no pudo completarse el ciclo total del *Paramphistomum* spp. Las fallas fueron en los dos puntos críticos del ciclo biológico, esto es, en las infecciones experimentales de ambos hospedadores – intermediario y definitivo. Sin embargo, el resto de los pasos se realizaron con éxito.

Se logró obtener 118 metacercarias de dos caracoles naturalmente infectados, que por sus características morfológicas, muy probablemente fueran de *Paramphistomum* spp. En este sentido, se pudo identificar además a *Drepanotrema depressissimum* como potencial hospedador intermediario del trematodo en Uruguay.

Se pusieron a punto las técnicas apropiadas para el mantenimiento de caracoles planorbideos en laboratorio, así como la metodología para la obtención e incubación de parásitos adultos, y la obtención e incubación de huevos y miracidios.

Si bien no se pudieron conseguir cortes histológicos de calidad que permitieran identificar la especie de los ejemplares de *Paramphistomum* spp. obtenidos de frigoríficos, muchos otros ejemplares quedan en la colección del Departamento de Parasitología para futuras investigaciones en este sentido.

Debido a el éxito en el mantenimiento in-vitro de ejemplares adultos de *Paramphistomum* spp. se pudo obtener un promedio y rangos del potencial biótico del parásito.

De lo reportado por algunos autores parecería que reproducir el ciclo biológico de *Paramphistomum* spp. resulta tarea rutinaria. Sin embargo, otros autores confirman muchas dificultades al momento de infectar caracoles planorbideos con miracidios del parásito. Investigadores argentinos (Ostrowski De Nuñez 1977) que también han estudiado el tema, (si bien con una especie de digenea que no es un paramfistómido) han confirmado que la infección experimental de caracoles no resulta ser fácil.

Esto es lo que parece haber sucedido en nuestro trabajo, aunque, de todas maneras, se han sentado las bases para posteriores estudios de la parasitosis por *Paramphistomum* spp. en Uruguay.

Estos estudios serían fundamentales para poder seguir adelante con otras investigaciones que aporten datos acerca de drogas efectivas para el tratamiento de las paramfistomiasis agudas y bases epidemiológicas para el control de la parasitosis a campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Acosta, Daniel. (1994).** Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en Uruguay. en: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Nari & Fiel. Editorial Hemisferio Sur. pp. 233 – 252.
2. **Albaret J. L.; Bayssade, D, C.; Guilhon J.; Kulo S.D.; Picot H. (1978).** Cycle biologique de *Paramphistomum togolense n. sp.* (Trematoda, Paramphistomidae). *Annal. Parasitol. Hum. Comp.*, 53: 495-510.
3. **Arrieche, P.; Viñas, J. (2007).** Efecto sobre la ganancia de pesos en terneros parasitados con *Paramphistomum* spp. Tesis de grado Facultad de Veterinaria del Uruguay. Montevideo, FV. 21 p.
4. **Boray J.C. (1959).** Studies on intestinal amphistomosis in cattle. *Aust. Vet. J.*, 35: 282-287.
5. **Campbell, W. C.; (1961).** Notes on the eggs and miracidium of *Fascioloides magna* (trematoda). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 80: 308-319.
6. **Carballo, M.; Malfatto, R.; Pereyra, E.; Freyre, A.; Genovese, J. (1981).** Paramfistomiasis bovina en Uruguay. 1. *Veterinaria* (Montevideo), 78: 135-139.
7. **Castro, O.; Heinzen, T.; Carballo, M, (2001).** Dinámica de infección de *Lymnaea viator* con *Fasciola hepatica* en condiciones naturales en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo), 36(142):13-18.
8. **Castro, T., L.; Garcia Vasquez, Z; Casildo Nieto, J: (1990).** The suseptibility of Lymnaeid snails to *Paramphistomum cervi* infections in Mexico. *Vet. Parasit*; 35: 157-165.
9. **Correa, O.; Castro, O. (2007).** Paranfistomosis: una parasitosis de los rumiantes prevalente en establecimientos productivos de todo el país. V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 153 p.
10. **Cruz, C, F. (2001).** Enfermedades gastrointestinales producida por trematodos en bovinos. Disponible En: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/.../BtRgCliG004.pdf>. Fecha de consulta: 23/07/12.
11. **De Waal, T. (2010).** *Paramphistomum* a brief review. Disponible en http://www.veterinaryirelandjournal.com/Links/PDFs/CE-Large/CELA_May_2010.pdf Fecha de consulta: 27/11/2011.

12. **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. Parasit*, 140: 281-288.
13. **Dinnik, J. A.; Dinnik, N.N. (1954).** The life cycle of *Paramphistomum microbothrium* Fiscoeder, 1901 (Trematoda, paramphistomidae). *Parasitology*, 44: 225-299.
14. **Dinnik, J. A., Dinnik, N, N. (1960).** Development of *Carmyerius exoporus* Maplestone (Trematoda: Gastrothylacidae) in a snail host. *Parasitology*, 50: 469-480.
15. **Dirksen GH, Dieter M, Stober. (2005).** Medicina interna y cirugía del bovino. 4a ed. Buenos Aires, Intermedica. 1172p.
16. **Freyre, A. (1987).** *Paramphistomum cervi* y *P. ichikawai* (Trematoda, Paramphistominae) en vacunos de Uruguay. *Rev Soc Urug Parasitol*, 181:35-40.
17. **Freyre, A.; D'Angelo, J.M.; Hernandez, Z.; Gedda, C.; Méndez, J. (1989).** Significación de las Paramphistomosis en algunos departamentos del Uruguay. Universidad de la República, Programa de Biología Parasitaria , 1ª Seminario- Taller, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay 40p.
18. **Gretillat, S. (1959).** Recherche sur le cycle évolutif de *Carmyerius dollfusi* Golvan, Chabaud et Grétilat 1957 (Trematoda, Gastrothylacidae) à Madagascar. *Comp. Rend. Séanc. Acad. Sci.*, 248: 1873-1875.
19. **Guzmán, C, H,; Hernández, H, A. (1992).** Prevalencia de *Paramphistomum* sp. en bovinos del municipio de Medina, Casanare. Trabajo de grado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 73p.
20. **Horak IG. (1967).** Host – Parasite relationships of *Paramphistomum microbothrium* (Fiscoeder, 1901), in experimentally infested ruminants, with particular reference to sheep. *J Vet. Res.* 34 (2): 451-540.
21. **Iglesias Piñeiro, J.;Castillejo Murillo, J.; Ribadulla Nogueira, P. (2010).** “Dinámica de poblaciones de moluscos gasterópodos que actúan como hospedadores intermediarios de *Fasciola hepatica* y Paramphistomidae en Galicia, y desarrollo de un modelo matemático de predicción de enfermedades parasitarias”. Instituto Nacional de investigación y Tecnología agraria y alimentaria. Universidad de Santiago de Compostela proyecto de investigación FAU2006-00021-C03-03.
22. **Kassai, T. (2002).** Helminología Veterinaria. Zaragoza: Acribia. 258p.

23. **Lopez, P.; Romero,; Velasquez, E. (2008).** Aislamiento de *Paramphistomidae* en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja del trópico alto en el occidente de Colombia. Rev. Colom. Cienc. Pecuaria. vol. 21 n° 1.
24. **Malfatto, R.; Carballo, M.; Freyre, A. (1982).** Paramphistomiasis bovina en Uruguay. 2. Veterinaria (Montevideo), 18 (80): 47-49.
25. **Muller, G. (1992).** Infecção natural e experimental de *Drepanotrema Kermtoides* (Planorbidae) com *Paramphistomum* spp. (Fischoder, 1901) no Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras Parasit Vet 1: 23-26.
26. **Muro Alvarez, A .; Ramajo Martín, V: (2002).** Parafistomosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo FA, Sánchez C, Hernández S, Navarrete J, Diaz P, Quiroz H, Carvalho M. Parasitología Veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana p. 225 – 228.
27. **Ostrowski De Nuñez M. (1977).** El ciclo biológico de *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum* (Lutz 1928) Dubois 1970 *Austrodiplostomum Mordax* (Szidat y Nani 1951) (Trematoda, Diplostomatidae). Rev Museo Arg Cienc Nat Bernardino Rivadavia Inst Nac Inv Cienc Nat 2(2): 7-75.
28. **Paiva, N. (1994).** Epidemiología y control de *Paramphistomum* en el Uruguay, En: Nari & Fiel, (ed). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos.. 1ª edición. Montevideo. Editorial Hemisferio Sur. pp. 257 – 264.
29. **Paraense, W, L. (1975).** Estado atual da sistemática dos planorbídeos Brasileiros en Arq. Mus. Nac., RJ /55: 105-128.
30. **Paz Silva, A. (2006).** Parafistomosis bovina: enfermedad emergente en el área mediterránea. Disponible en: http://www2.vet.unibo.it/staff/gentile/femesprum/./PDFs/.../Paz_A.pdf. Fecha de consulta: 30/06/30.
31. **Quiroz, H.; Ochoa, R. (1972).** Presencia de *Paramphistomum cervi* en un ovino de raza Tabasco o Pelibuey en Mexico. Tec. Pec. Méx.; 21:59.
32. **Radostits O, Gay C, Blood D, Hincheliff K. (2002).** Enfermedades causadas por trematodos y cestodos. En: Radostits O, Gay C, Blood D, Hincheliff K, Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino. 9a. ed. Madrid : Mc Graw – Hill. pp 1636-1645.

33. **Rimbaud, E.; Carballo, M.; García da Rosa, E.; Lahiriyo, R.; Lorenzo, P.; Silva, R.; Méndez, A.; Cattáneo, M.; Ricciari, P. (1999).** Primera comprobación de paramphistomiasis ovina en el Uruguay. I Congreso Latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sud americanos 23 – 24 de setiembre, Montevideo, Uruguay. /2/ p.
34. **Rodríguez, Izaguirre, L. (2011).** La paramfistomiasis y su tratamiento. Disponible en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_rodriguez_izaguirre.pdf. Fecha de consulta: 12/04/12.
35. **Rolfe, P, F,; Boray, J, C,; Collins, G, H. (1994).** Pathology of infection with *Paramphistomum ichikawai* in sheep. Internat J Parasitol, 24 (7): 995-1004.
36. **Sanabria, R. (2007).** Paramfistomiasis en los ovinos. En: Suarez,V.H.; Olachea, F.V., Rossanigo, C.E.; Romero J. R. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA, PT. 70, EEA-INTA Anguil, Argentina. p 169-177.
37. **Saumell, C.; Fusé, L.; Iglesias, L.; Steffan, P.; Fiel, C. (2005).** Alternativa adicional al control químico de nematodos gastrointestinales en animales domésticos. En: Resistencia a los parásitos internos en Argentina. Disponible en: <http://cni.inta.gov.ar/patobiologia/pdf%20parasitarias/Resistencia%20%20a%20%20antihelminticos%20en%20Argentina.pdf>. Fecha de consulta: 23/07/12.
38. **Scarabino, F. (2004).** Lista sistemática de los gastropoda dulciacuícolas vivientes de Uruguay. Comun Soc Malacol Urug. 8: 347-356.
39. **Seck, M, T,; Marchand, B; Ba, C,T,; Diaw O, T. (2006).** *Bulinus forskalii* (Basommatophore : Planorbidae), nouvel hôte intermédiaire expérimental du trématode *Paramphistomum microbothrium* Fischoeder 1901. Pathologie Parasitaire, Rev Elev. Med. Vet. Pays Trop 59 (1-4) : 17-21.
40. **Sey, O. (1979).** Life-cycle and geographical distribution of *Paramphistomum daubneyi* Dinnik, 1962 (Trematoda: Paramphistomata). Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 27: 115-130.
41. **Spence, S, A; Fraser, G, C,; Chang, S. (1996).** Response in milk production to the control of gastro-intestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. Aust. Vet. J. 74: 456-459.
42. **Travassos, L,; Freitas, J, F, T,; Kohn, A. (1969).** Trematódeos do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 67 (1): 1-886.

43. **Archivo veterinario del este.** Publicación trimestral del Laboratorio Regional Este de DILAVE "Miguel C Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Disponible en: www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm publicación 15-oct-2010. Fecha de consulta: 18/05/12.
44. **Archivo veterinario del este.** Publicación trimestral del Laboratorio Regional Este de DILAVE "Miguel C Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Disponible en: www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm publicación 31-ene-2011. Fecha de consulta: 18/05/12.