Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Ecoepidemiología de Fasciola hepática (Trematoda, Digenea) en el norte de la provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de Lymnaea columella (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como hospedador intermediario

Prepelitchi, Lucila

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Prepelitchi, Lucila. (2009). Ecoepidemiología de Fasciola hepática (Trematoda, Digenea) en el norte de la provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de Lymnaea columella (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como hospedador intermediario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Prepelitchi, Lucila. "Ecoepidemiología de Fasciola hepática (Trematoda, Digenea) en el norte de la provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de Lymnaea columella (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como hospedador intermediario". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

ECOEPIDEMIOLOGÍA DE *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) EN EL NORTE DE LA PROVINCIA DE CORRIENTES DESTACANDO ASPECTOS ECOLÓGICOS DE *Lymnaea columella* (Pulmonata, Lymnaeidae) Y SU ROL COMO HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Lucila Prepelitchi

Director de tesis: María Cristina Wisnivesky
Consejero de Estudios: María Cristina Wisnivesky

Buenos Aires, octubre de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por haberme otorgado la beca con la cual pude llevar adelante esta investigación,

Al Departamento de Ecología, Genética y Evolución, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por haberme brindado un lugar trabajo donde poder desarrollar esta investigación,

A la Dra. Cristina Wisnivesky, mi directora, por contagiarme su pasión por la Parasitología, por dejarme trabajar con total libertad, por confiar en mí para este trabajo y por haberme dado la posibilidad de ingresar a su grupo de investigación,

A los Dres Moriena, Racioppi y Alvarez por estar en forma incondicional cada vez que estuve en Corrientes, por ocuparse de todos los detalles para que cada viaje fuera impecable, por abrirme las puertas de su laboratorio, por estar siempre con la mejor predisposición, por enseñarme los secretos del campo Correntino, del saguaipé y demás observaciones curiosas,

Al Dr. Fernández por dejarme trabajar en su establecimiento,

A la Lic. Silvia Pietrokovsky por enseñarme a razonar, a cuestionar, a entender, por transmitirme sus conocimientos, por compartir su sabiduría conmigo, por dedicarle HORAS, DIAS, MESES y AÑOS a resolver cuestiones inherentes a este trabajo, por su paciencia infinita, por sus ganas de enseñarme, por asesorarme, por escucharme, por haber estado horas procesando conmigo caracoles y materia fecal,

A la Dra. Florencia Kleiman por introducirme en el mundo científico al proponerme como candidata para llevar adelante esta tesis. Por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo,

A la Dra. Diana Rubel por llevarme por primera vez al campo y contagiarme su pasión por estar allí disfrutando no sólo del trabajo, por los ataques de risas, por asesorarme cada vez que lo necesité, por estar siempre disponible y dispuesta, por haberme acompañado en algunos muestreos, por convencerme de recorrer lugares inhóspitos en ciudades desconocidas (Puerto de Barranqueras),

A la Lic. Laura Issia por ayudarme en el campo y en el laboratorio,

A la Lic. Marcela Cucher por haberme ayudado en el campo,

A la Dra. Margarita Ostrowski de Núñez por seguir presente todos estos años y estar siempre interesada en mi trabajo, por ser una persona de consulta permanente,

Al Dr. Darío Vezzani y al Dr. Anibal Carbajo por interesarse en mi trabajo, por ofrecerse para lo que pudiera necesitar y por hacer más divertidas las jornadas laborales,

Al todos mis compañeros de laboratorio por apoyarme y soportarme en los momentos más difíciles y hacer que ir a trabajar sea un placer,

A Darío por haberme acompañado durante todo este proceso, por haber sobrevivido a mis diferentes estados ánimo, por haberme apoyado en mi decisión de hacer ciencia, por intentar contínuamente entender a que me dedico todos los días, pero fundamentalmente por estar siempre,

A mis chiquitos, Diego y Alejo, por haber resistido y haberme compartido con esta tesis, por adaptarse desde bebés a mis horarios, por recibirme después de cada jornada laboral con la mejor sonrisa, por hacer que mi vida sea hermosa,

A mi Papá y mis hermanos por acompañarme,

A mis amigos por apoyarme,

A mis abuelos por estar orgullosos de mí sin importar el título al cual aspire,

A mi suegra por bancarme durante los muestreos y cuando fue necesario,

A todos GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDOS Página

Agradecimientos
Resumen **6**
Abstract **7**

***Capítulo 1*: INTRODUCCIÓN**

1.1 Generalidades 8
1.2 *Fasciola hepatica*
1.2.1 Ciclo de vida 10
1.2.2 Características de la infección por *F. hepatica* en el hospedador intermediario 14
--- Identificación de *F. hepatica* 15
1.2.3 Características de la infección por *F. hepatica* en el hospedador definitivo 16
--- Diagnóstico 18
1.2.4. Epidemiología de la fasciolosis 19
1.3 Objetivos de la tesis 21
1.4 Estructura de la tesis 22

***Capítulo 2*: CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE**

2.1 Selección del área de estudio 23
2.2 Caracterización del área de estudio
2.2.1 Provincia de Corrientes 27
2.2.2 Macrosistema del Iberá 31
2.2.3 Berón de Astrada 37

***Capítulo 3*: MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Selección del lugar de estudio 39
3.2. Variables climáticas 40
3.3. Hospedador definitivo 45
3.3.1. Actividades realizadas en el establecimiento 46
--- Muestreos
3.3.2. Actividades realizadas en el laboratorio 48
--- Método de diagnóstico
3.3.3. Análisis estadístico
--- Infección por *F. hepatica* en el primer período húmedo 49
--- Infección por *F. hepatica* en 2 cohortes en el período seco, de recarga y segundo húmedo 49
--- Infección por *F. hepatica* por categoría etaria entre períodos 50
3.4. Hospedador intermediario 50
3.4.1. Actividades realizadas en el establecimiento
--- Muestreos 50
--- Ambientes 51
--- Sitios de muestreos 52
--- Recolección de caracoles 52
--- Variables ambientales 54
3.4.2. Actividades realizadas en el laboratorio
--- Caracoles de la familia Lymnaeidae
--- Identificación taxonómica 54
--- Abundancia y estructura poblacional 55
--- Infección por *F. hepatica* 56
--- Caracoles no lymneidos 57
3.4.3. Análisis estadístico
--- Variables ambientales 57
--- Abundancia 58
--- Estructura poblacional 58
--- Infección
--- Infección por *F. hepatica* en lymneidos durante todo el estudio 58
--- Infección por *F. hepatica* en lymneidos dentro del primer período húmedo 59
3.5. Dinámica de transmisión 60

Capítulo 4: **IDENTIFICACIÓN DEL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO DE *Fasciola hepatica*** página

4.1. Introducción 61
4.2. Objetivos 64
4.3. Materiales y métodos 64
4.4. Resultados 64
4.4.1. Descripción morfológica 64
4.4.2. Comparación con otros lymneidos de Argentina 67
4.5. Discusión 69
4.6. Conclusiones 72

Capítulo 5**: ABUNDANCIA, DINÁMICA POBLACIONAL Y ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Lymnaea columella***

5.1. Introducción 73
5.2. Objetivos 76
5.3. Hipótesis 76
5.4. Materiales y métodos 76
5.5. Resultados 77
5.5.1. Ambientes 77
5.5.2. Abundancia 82
5.5.3. Aspectos biológicos de *L. columella* 88
5.5.4. Estructura poblacional 91
5.6. Discusión 95
5.6.1. Abundancia 96
5.6.2. Estructura poblacional 99
5.7. Conclusiones 105

Capítulo 6**: DINÁMICA DE TRASMISIÓN DE *F. hepatica***

6.1. Introducción 107
6.2. Objetivos 111
6.3. Hipótesis 111
6.4. Materiales y métodos 112
6.5. Resultados 113
6.5.1. Infección en el hospedador definitivo
--- Infección por *F. hepatica* en el primer período húmedo 113
--- Infección por *F. hepatica* en 2 cohortes en el período seco, el de recarga y el segundo período húmedo 115
--- Infección por *F. hepatica* por categoría etaria entre períodos 117
6.5.2. Infección en el hospedador intermediario
--- Generalidades de la infección por *F. hepatica* en *L. columella* 118
--- Infección por *F. hepatica* en *L. columella* durante el período de estudio 119
--- Infección por *F. hepatica* en *L. columella* en el primer período húmedo por estación 122
6.5.3. Dinámica de transmisión 126
6.6. Discusión
6.6.1. Generalidades 129
6.6.2. Infección por *F. hepatica* en el ganado bovino 130
6.6.3. Infección por *F. hepatica* en *Lymnaea columella* 134
6.6.4. Dinámica de transmisión 140
6.6.5. Propuesta de un programa de control 145
6.7. Conclusiones 148

Capítulo 7**: BIBLIOGRAFÍA** 150

Anexo 1**:** Diagnóstico de *Fasciola hepatica* en el hospedador definitivo 165
Anexo 2**:** Protocolo para la fijación y conservación de moluscos de agua dulce 167
Anexo 3**:** Protocolo para la emisión de cercarias de *Fasciola hepatica* 168
Anexo 4: Trabajos científicos publicados a partir de la información generada en esta tesis 169

Ecoepidemiología de *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) en el Norte de la Provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de *Lymnaea columella* (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como hospedador intermediario

Resumen

La fasciolosis, causada por *Fasciola hepatica*, es una parasitosis de gran importancia para el ganado doméstico porque ocasiona importantes pérdidas económicas a nivel mundial. En Argentina es endémica y la cuarta enfermedad más importante para el ganado vacuno, su hospedador definitivo. Con el objetivo de describir la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en una región de Argentina con clima subtropical, se realizaron muestreos estacionales entre la primavera de 2002 y de 2005 en un establecimiento en el norte de la Provincia de Corrientes. Se identificó al caracol hospedador intermediario, se caracterizó su hábitat y se estudió su abundancia, estructura y dinámica poblacional en función de las condiciones climáticas y ambientales. Se estimó la prevalencia por *F. hepatica* en el hospedador intermediario y definitivo. Una sequía de 6 meses en el medio del estudio permitió estudiar su impacto en la población de caracoles y en la dinámica de transmisión de la fasciolosis.

En el la zona de estudio se detectó un foco de transmisión de *F. hepatica* bien establecido con altas prevalencias en ambos hospedadores. *Lymnaea columella* fue el único hospedador intermediario hallado, siendo éste su primer registro de infección natural por *F. hepatica* en Argentina. Antes de la sequía la prevalencia de *L. columella* osciló entre 0 y 9% y la del ganado bovino entre 7,9 y 95%. La mayor prevalencia se observó en otoño e invierno, cuando las variables climáticas no limitaron el desarrollo de los caracoles ni del parásito. Durante la sequía no se encontraron caracoles vivos y la prevalencia en el ganado disminuyó de 3,8% a cero. Cuando mejoraron las condiciones ambientales los caracoles se recuperaron rápidamente. La infección apareció simultáneamente en caracoles y en ganado un año después de la sequía, con prevalencias de 0,1% y 1,6%, respectivamente. Se recolectaron en total 7.851 *L. columella* en Bañados y Malezales, dos ambientes típicos del Macrosistema del Iberá. Durante los períodos húmedos se hallaron caracoles todo el año, con altas abundancias en invierno, intermedias en otoño y primavera y bajas en verano, siendo esta última la estación más crítica por las altas temperaturas y la falta de agua. Durante los períodos desfavorables los individuos medianos fueron los más resistentes y los que permitieron una rápida recuperación de la población.

La dinámica de transmisión de *F. hepatica* en la zona de estudio estuvo influenciada principalmente por la disponibilidad de agua. Con suficiente humedad en el ambiente la transmisión se produce durante todo el año pero ante una sequía de 6 meses de duración se interrumpió naturalmente. El calor y la falta de agua producirían la muerte de los estadios de vida libre del parásito y de los caracoles infectados, disminuyendo la contaminación de las pasturas. En base a esta información se propone un programa de control de la fasciolosis que podría hacerse extensivo a otras regiones con climas y ambientes semejantes al de la zona de estudio.

Palabras Claves: *Fasciola hepatica*, *Lymnaea columella*, Fasciolosis, Epidemiología, Transmisión, Humedales

Ecoepidemiology of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the north of the Province of Corrientes emphasizing ecological aspects of *Lymnaea columella* (Pulmonata, Lymnaeidae) and its role as intermediate host

Abstract

The fasciolosis, caused by *Fasciola hepatica*, is a parasitic disease of great veterinary importance due to major economic losses in livestock, the definitive host. In Argentina, fasciolosis is endemic and the fourth most important livestock disease. To investigate the transmission dynamics of *F. hepatica* in a subtropical Argentine region, seasonal samplings were performed over a three-year study period between spring 2002 and 2005 in a cattle farm in the north of Corrientes Province. The intermediate snail host was identified and its habitat was characterized. The abundance and population structure and dynamics were analyzed in relation to climate and environmental conditions. The prevalence of *F. hepatica* infection was determined in both hosts. A 6-month drought occurring in the middle of the study was an opportunity to investigate its impact on the snail population and on the transmission dynamics.

A well-established transmission focus of *F. hepatica* was detected in the study area, with high prevalence values in both hosts. *Lymnaea columella* was the only intermediate host found, this being the first record of natural infection of this snail with *F. hepatica* in Argentina. Before the drought, the prevalences of *L. columella* and cattle ranged between 0-9% and 7.9-95%, respectively. The highest prevalence values were obtained in autumn and winter, when climate conditions favored snail and parasite development. No snails were found during the drought and prevalence in cattle decreased from 3.8% to zero. The snail population achieved full recovery when environmental conditions became milder. Infection appeared simultaneously in snails and cattle one year after the drought, with prevalences of 0.1 and 1.6%, respectively.

A total of 7,851 *L. columella* were collected in Bañados and Malezales, two typical environments of the Iberá Macrosystem. Snails were found throughout the humid periods, with high abundances in winter, intermediate in autumn-spring and low in the hot, dry summer. The medium-sized snails were more tolerant to unfavorable environmental conditions, allowing a rapid population recovery.

The transmission dynamics of *F. hepatica* in the study area was mainly influenced by water availability: transmission occurs all year round in humid periods and it is naturally interrupted by a 6-month drought. High temperature and lack of water may lead to the death of free-living parasite stages and infected snails, thus limiting pasture contamination. A fasciolosis control program is proposed based on the information provided herein, which may be extended to other regions with similar climates and environments.

Key words: *Fasciola hepatica*, *Lymnaea columella*, Fasciolosis, Epidemiology, Transmission, Wetlands

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La **epidemiología** es la ciencia que estudia la frecuencia y la distribución de las enfermedades en las poblaciones, los factores que permiten predecir la aparición, la permanencia y la severidad de las mismas y el desarrollo de programas de control y/o prevención (Traub *et al.*, 2005). Si bien esta definición está formulada en el contexto de la salud humana, en el marco de las enfermedades parasitarias el término epidemiología se aplica tanto a los animales como al ser humano (Quiroz, 2005).

La epidemiología de las enfermedades parasitarias de principios del siglo XX estaba basada en el modelo individuo-agente infeccioso y se utilizaba para explicar y controlar las infecciones emergentes (Smith *et al.*, 2005). A fines de ese siglo se empezó a analizar la infección a nivel poblacional dentro de un sistema de parásitos y hospedadores que interactúan entre sí. Surge así la **ecoepidemiología** que estudia los efectos de las parasitosis en las poblaciones, los patrones temporales y espaciales de su aparición y persistencia, la interacción de los factores ambientales con las poblaciones de parásitos y hospedadores y su influencia en la dinámica de transmisión (Smith *et al.*, 2005).

La interacción biológica entre un parásito y su hospedador es probablemente el tipo de interacción interespecífica más especializada (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001) y recibe el nombre de **parasitismo**. El parásito vive a expensas de su hospedador, se alimenta de sus tejidos y/o sustancias metabólicas, afectando su fitness y ocasionándole importantes daños (Berenguer, 2007). La **interacción hospedador-parásito** suele ser muy compleja e involucra entre otras, características genéticas, biológicas y ecológicas (Esch *et al.*, 2002). Esta compleja relación se manifiesta, entre otros aspectos, por la especificidad del parásito hacia sus hospedadores, llegando en algunos casos a parasitar una única especie (Esch y Fernandez, 1994). El daño relativo que sufre cada hospedador varía entre individuos y depende de la condición general de cada uno, la cual está determinada por el estado

nutricional, la presencia de otras parasitosis, la eficacia de la respuesta inmune y el nivel de estrés (Wisnivesky, 2003). Los parásitos pueden modificar la **supervivencia** de sus hospedadores ya sea en forma directa cuando su presencia mata a los individuos infectados, o en forma indirecta, cuando les disminuye la capacidad para competir o les aumenta la vulnerabilidad frente a los predadores (Minchella *et al.*, 1985). Los parásitos también pueden reducir la **capacidad reproductiva** de sus hospedadores ya sea directamente dañando los órganos reproductivos y diminuyendo su fecundidad, o indirectamente disminuyendo su **tasa de crecimiento**, afectando su maduración sexual (Minchella *et al.*, 1985). Por lo expuesto se concluye que las infecciones parasitarias actúan como potentes agentes de selección natural de las poblaciones de hospedadores (Wisnivesky, 2003).

La propagación de cualquier parásito requiere de la presencia de un hospedador susceptible y de un mecanismo eficiente de **transmisión** entre ellos. En el caso de los endoparásitos el hospedador es el ambiente inmediato del parásito y se acepta comúnmente que este último posee poco requisitos ambientales, más allá de la presencia de hospedadores susceptibles (Wullschleger y Jokela, 1999). Por lo tanto, en estos casos, la hipótesis de que algunos **hábitats** *per se* no son adecuados para el parásito aún estando presentes sus hospedadores, difícilmente sea cierta (Wullschleger y Jokela, 1999). Sin embargo, muchos parásitos tienen estadios de vida libre en sus ciclos de vida y sólo durante algunos períodos están en íntimo contacto con el hospedador. En consecuencia, estos parásitos deben adaptarse a un hábitat vivo (hospedador) y al ambiente externo (Wisnivesky, 2003). El ambiente externo ejerce influencia en los parásitos que se transmiten entre varios hospedadores (intermediarios y definitivos), restringiéndolos a los ambientes donde todos ellos son simpátricos (Wullschleger y Jokela, 1999). De acuerdo con Pavlovsky (1966), las enfermedades poseen hábitats naturales en el mismo sentido que las especies. Para este autor, las parasitosis en particular, están localizadas naturalmente en ambientes denominados **focos naturales** incluidos en áreas geográficas claramente definidas. Los focos naturales son unidades ecológicas o porciones de un cierto paisaje, que incluyen una comunidad de animales formada por el parásito, los vectores y los hospedadores y el ambiente externo o abiótico que facilita la circulación del parásito y la persistencia del mismo en la naturaleza (Wisnivesky, 2003). De lo expuesto se desprende que para conocer el modo de transmisión de los parásitos que se transmiten entre varios hospedadores es necesario conocer las condiciones abióticas locales, la interacción de los hospedadores con su hábitat, la interacción entre los hospedadores y el parásito y la historia de vida de éste último (Haseeb y Fried, 1997).

Los parásitos del Phylum: Platyhelminthes, Clase: Trematoda, Subclase: **Digenea** se hallan dentro del grupo de los que se transmiten entre varios hospedadores.

El **ciclo de vida** de los digeneos involucra un hospedador definitivo, en general un vertebrado, donde el parásito alcanza la madurez sexual, por lo menos un hospedador intermediario, donde se produce la multiplicación larval (esporoquiste, redias y cercarias) y estadios de vida libre (miracidios y cercarias) (Haseeb y Fried, 1997). El primer hospedador intermediario generalmente es un caracol con respecto al cual los digeneos poseen una gran especificidad. El estadio infectivo para el hospedador definitivo es la metacercaria y para el primer hospedador intermediario, el miracidio.

Si bien el hospedador intermediario juega un rol fundamental en el ciclo de transmisión porque el parásito se multiplica asexualmente en él y aumenta en forma exponencial el número de larvas, el hospedador definitivo es importante en la diseminación de la infección debido a su mayor capacidad para trasladarse (Haseeb y Fried, 1997). Para entender el modo de transmisión en este tipo de ciclos es esencial conocer la biología de los hospedadores intermediarios y definitivos. Mas aún, la dinámica de transmisión de las infecciones por digeneos sólo puede ser comprendida teniendo en cuenta los factores abióticos que regulan las poblaciones de hospedadores intermediarios y aquellos que influyen en el desarrollo de los estadios de vida libre del parásito (Haseeb y Fried, 1997).

1.2 *Fasciola hepatica*

1.2.1 Ciclo de vida

Fasciola hepatica (Linneaus, 1758) pertenece al Phylum: Platyhelminthes, Clase: Trematoda, Subclase: Digenea, Orden: Echinostomata, Superfamilia: Echinostomatoidea, **Familia: Fasciolidae** (Schmidt y Roberts, 1977).

El ciclo de vida de *F. hepatica* puede dividirse en tres fases como se muestra en la Figura 1.1: A) dentro del hospedador definitivo (juveniles, adultos y huevos), B) dentro del hospedador intermediario (esporoquistes, redias y cercarias) y C) en el medio ambiente (huevos, miracidios, cercarias y metacercarias).

Los hospedadores definitivos de *F. hepatica* son mamíferos herbívoros, ovinos, bovinos, caprinos, suinos, equinos, camélidos, lagomorfos y los humanos, entre otros, que adquieren la infección al ingerir metacercarias adheridas en la vegetación o suspendidas en el agua. Después de aproximadamente una hora la metacercaria comienza a desenquistarse y una vez liberado del quiste el **juvenil** atraviesa la pared intestinal y migra por la cavidad

abdominal hacia el hígado (Andrews, 1999). A los 4-6 días post-infección el juvenil alcanza el hígado, penetra la cápsula de Glison y migra a los ductos biliares alcanzándolos a las 5-6 semanas post-infección, donde se establece definitivamente y se convierte en **adulto** (2-3 meses post-infección) (Andrews, 1999). Cada fasciola incrementa hasta 100 veces su tamaño desde que se desenquista y hasta que alcanza los ductos biliares (Fig. 1.2 A,B) y este crecimiento es a expensas de consumir tejido hepático del hospedador definitivo lo cual le produce profusas hemorragias y fibrosis. A partir de la 8va semana post-infección comienza el período patente de la infección, con la aparición de **huevos** de *F. hepatica* en la bilis y con posterioridad en la materia fecal del hospedador (Fig. 1.1 A) (Andrews, 1999).

Los **huevos** son operculados, de color amarillo, levemente amarronados, ovalados y no están embrionados en la materia fecal (Fig. 1.2 C). Es indispensable que el huevo entre en contacto con el agua para que comience el desarrollo del embrión (Fig. 1.1 C) (Andrews, 1999). La tasa de desarrollo de los huevos aumenta con la temperatura en el rango de 10ºC y 30ºC, tardando 6 meses a 10ºC, 2-3 meses a 16ºC, 2-3 semanas a 24ºC y 8 días a 30ºC (Andrews, 1999). El desarrollo de los huevos se inhibe considerablemente por encima de los 30ºC y completamente por encima de los 37ºC, temperatura a la cual también aumenta la mortalidad (Andrews, 1999). Los huevos sobreviven en heces húmedas hasta 10 semanas en verano y hasta 6 meses en invierno, pero mueren rápidamente en ausencia de agua o una superficie húmeda (Andrews, 1999). Una vez completado el desarrollo del huevo emerge una larva ciliada, nadadora, llamada **miracidio** (Fig. 1.1 B y Fig. 1.2 D), que debe buscar activamente al hospedador intermediario, caracoles de la familia Lymnaeidae. Los miracidios, al igual que otros estadios larvales de vida libre no se alimentan, por lo que tienen aprox. 24 hs antes de que se acaben sus reservas para encontrar y penetrar en el caracol (Andrews, 1999). Los miracidios de *F. hepatica* poseen fototropismo positivo y geotropismo negativo, lo cual les facilita encontrar al caracol (Andrews, 1999), ya que los lymneidos suelen vivir en los bordes de arroyos o pequeños cuerpos de agua y en ambientes con poca profundidad (Malek, 1985). La penetración del miracidio ocurre por cualquier parte del cuerpo del caracol aunque es más exitosa por la cavidad pulmonar.

En el caracol se produce la multiplicación asexual de *F. hepatica*. Dentro del caracol el miracidio se transforma en el siguiente estadio larval, el **esporoquiste** (Fig. 1.1 B) que migra hacia el hepatopáncreas. El esporoquiste tiene forma de bolsa y contiene masas de células germinales que darán origen a las **redias** (Fig 1.1 B). Las redias maduras abandonan el esporoquiste rompiendo su pared del cuerpo y se desarrollan en el mismo caracol. Miden entre 1 y 3 mm, poseen una boca, una faringe y un intestino ciego y se alimentan de los tejidos del caracol, causándole daños importantes en el aparato digestivo y reproductor

(Pinheiro *et al.*, 2004). Las redias poseen células germinales en el extremo posterior de su cuerpo a partir de las cuales se desarrollan las **cercarias**.

Cuando las condiciones ambientales son desfavorables las redias pueden producir una segunda generación de redias, retrasando la producción de cercarias hasta que mejoren las condiciones (Pinheiro *et al.*, 2004).

Por cada miracidio que penetra en el caracol pueden desarrollarse entre 800 y 4.000 cercarias (Andrews, 1999). Las **cercarías maduras** abandonan las redias y rompen el tejido del caracol saliendo al medio ambiente (Fig. 1.1 C y Fig. 1.2 F). La emergencia de las cercarias suele ocurrir entre las 4 y 7 semanas posteriores al ingreso de los miracidios y es estimulada por la luz, debido a que éstas poseen fototropismo positivo. La temperatura óptima para la emergencia de las cercarías coincide con la temperatura a la cual el caracol alcanza su máxima actividad (Graczyk y Fried, 1999). Las cercarias son el segundo estadio de vida libre en el ciclo de *F. hepatica* y al igual que los miracidios no se alimentan, por lo que su expectativa de vida (24 h aprox.) depende, entre otros factores, de la temperatura externa y de la cantidad de glucógeno y grasas que acumularon durante su fase en el caracol (Graczyk y Fried, 1999). Al aumentar la temperatura en el ambiente, aumenta la cantidad e intensidad de los movimientos y, en consecuencia, disminuyen más rápidamente sus reservas (Graczyk y Fried, 1999). Una vez en el agua las cercarias se dirigen hacia la superficie (geotaxismo negativo) y nadan activamente en busca de un lugar donde enquistarse. Para hacerlo se adhieren a diferentes sustratos (hojas, plantas, rocas, superficie del agua, etc.), pierden la cola y secretan una sustancia gelatinosa que las cubre y las protege. Los quistes o **metacercarias** (Fig. 1.1 C,A y Fig. 1.2 E) son el estadio infectivo para el hospedador definitivo y constituyen formas de resistencia, ya que bajo determinadas condiciones pueden sobrevivir y permanecer infectivas por mucho tiempo. La supervivencia y la infectividad de las metacercarias disminuyen al aumentar la temperatura. A -20ºC pierden la infectidad pero no mueren, entre -10 y -2ºC resisten el congelamiento y se mantienen infectivas, entre -3 y 5ºC sobreviven aproximadamente un año, entre 12-14ºC 6 meses, a 20ºC 8 semanas y a 25ºC 6 semanas o menos (Andrews, 1999). En condiciones naturales, se observó que las metacercarias son destruidas rápidamente por el calor y la sequía (Boray, 1969).

Figura 1.1: Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*. **A.** Desarrollo en el hospedador definitivo, **B.** Desarrollo en el hospedador intermediario, **C.** Desarrollo en el medio ambiente.

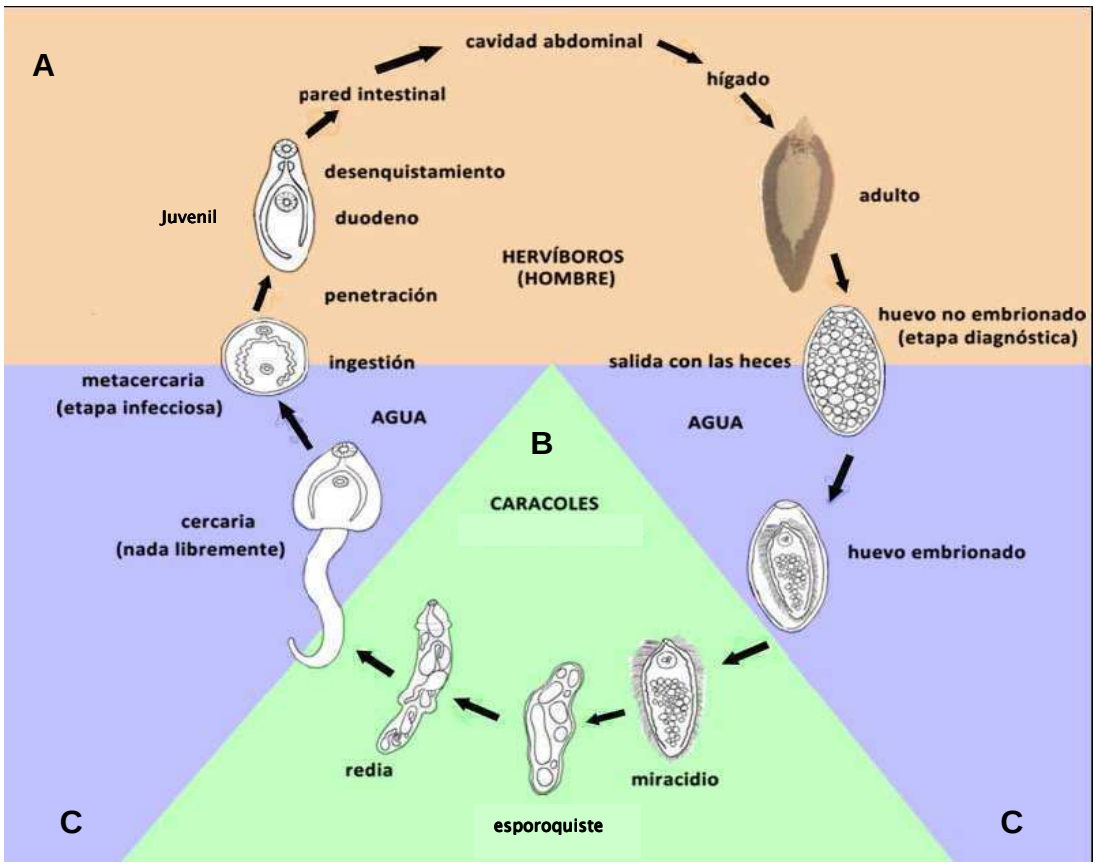
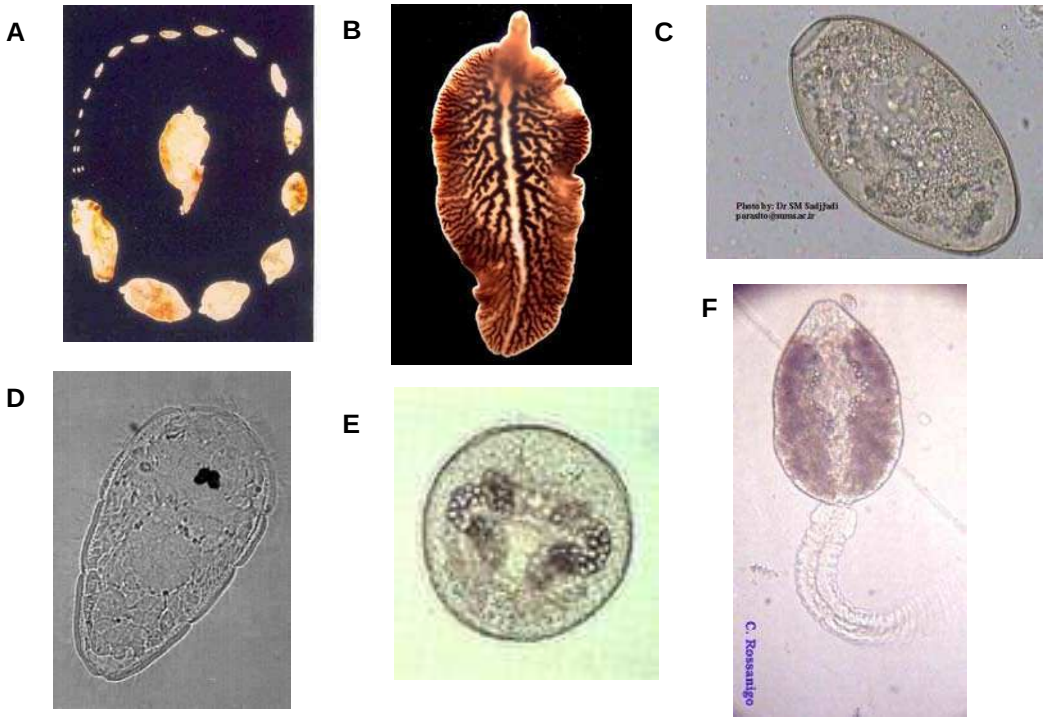


Figura 1.2: Estadios del ciclo de vida de *F. hepatica*. **A.** juveniles y adultos, **B.** adulto, **C.** huevo, **D.** miracidio, **E.** metacercaria, **F.** cercaria.



1.2.2 Características de la infección por *F. hepatica* en el hospedador intermediario

Fasciola hepatica posee una gran especificidad hacia su hospedador intermediario ya que sólo se desarrolla en caracoles de la familia Lymnaeidae. Estos caracoles están distribuidos en todo el mundo aunque son más abundantes en las zonas templadas del Hemisferio Norte (Malek, 1985). Son caracoles pulmonados, en su mayoría anfibios, capaces de vivir sobre el fango aunque existen algunas especies más acuáticas que se desarrollan a varios centímetros de profundidad. Habitan una gran variedad de ambientes dulceacuícolas temporarios y permanentes, poco profundos, de aguas claras con poca corriente, etc (Malek, 1985) (ver capítulo 4 para más detalles).

No todas las especies de lymneidos son igualmente susceptibles a *F. hepatica* y tanto los factores extrínsecos (condiciones ambientales de cada región) como los intrínsecos (estado nutricional, tamaño, madurez sexual, etc.) influyen en el rol de cada especie como hospedador intermediario (Mattos y Ueno, 1986; Minchella *et al.*, 1985; Ollerenshaw, 1971a). Algunos lymneidos actúan como el hospedador intermediario principal de *F. hepatica* y otros juegan un rol secundario en la transmisión del parásito (Boray, 1981).

En Europa, por ejemplo, el hospedador intermediario principal de *F. hepatica* es *Lymnaea truncatula* y los secundarios son *Lymnaea glabra* y *Lymnaea palustris* (Boray, 1981). En África, *L. truncatula* también es el hospedador intermediario principal y la especie introducida desde América del Norte*, Lymnaea columella* el secundario (Appleton, 2003). En América del Norte, *Lymnaea bulimoides, Lymnaea cubensis* y *L. truncatula* son los hospedadores principales (Boray, 1981; Malone *et al.*, 1984) y *L. columella* el secundario (Malone, 1994). En América Central, *L. cubensis* actúa como el hospedador principal y *L. columella* como el secundario (Boray, 1981). En la mayoría de los países de América del Sur *Lymnaea viatrix*, *L. cubensis* y *L. truncatula* están identificadas como los principales hospedadores de *F. hepatica* (Kleiman *et al.*, 2007; Pointier *et al.*, 2006; Samadi *et al.*, 2000 , respectivamente), mientras que en Brasil, la especie introducida *L. columella* es el principal hospedador intermediario (Amato *et al.*, 1986). En Nueva Zelanda y en Australia si bien la especie nativa *Lymnaea tomentosa* es un eficiente hospedador de *F. hepatica*, la especie introducida *L. columella* parece ser responsable de la diseminación de la fasciolosis en zonas donde la especie nativa no está presente (Boray *et al.*, 1984; Harris y Charleston, 1976).

1.2.2.1. Identificación de *F. hepatica*

La identificación de *F. hepatica* en el hospedador intermediario puede realizarse a partir de diferentes técnicas. Por un lado están las técnicas directas como el aplastamiento, la disección de los caracoles o la observación de emisión de cercarias, que se basan en las características morfológicas del parásito. El aplastamiento de los caracoles es el método más utilizado para detectar infección en caracoles provenientes del campo, a pesar de que sólo brinda información sobre la prevalencia[1] de infección (y no la intensidad[2]) (Caron *et al.*, 2008). La disección de los caracoles es el método más usado en infecciones experimentales ya que permite calcular la prevalencia, la intensidad y la producción de cercarias (Caron *et al.*, 2008). La observación de emisión de cercarias puede utilizarse para evaluar la eficiencia de esa especie como hospedador intermediario y su contribución a la contaminación de las pasturas, pero no es un buen indicador de la prevalencia ya que muchos caracoles no emiten cercarias, a pesar de estar infectados con cercarias maduras (Vignoles *et al.*, 2002). Tampoco es un buen indicador de la intensidad de la infección ya que sólo tiene en cuenta a las cercarias.

Si se utilizan estas técnicas, la identificación de *F. hepatica* debe realizarse a partir de las características morfológicas de las **cercarias maduras**, ya que presentan caracteres diagnósticos específicos (Andrews, 1999). En cambio, las redias de *F. hepatica* poseen caracteres morfológicos similares a otras redias de la superfamilia Echinostomatoidea, que también pueden infectar a los caracoles lymneidos (Carvalho *et al.*, 2001; Prepelitchi y Ostrowski de Nuñez, 2007). Por lo tanto, cuando se trabaja con lymneidos infectados naturalmente y no existe información sobre que otras especies de Echinostomatoideos están presentes en la zona de estudio, la determinación específica debe realizarse a partir de las características morfológicas de las cercarias maduras y no de las redias (Ostrowski de Nuñez, com. pers). No obstante, solo se podría identificar a *F. hepatica* a partir de las redias, si al cabo de numerosos muestreos durante un período prolongado de tiempo solo se hubieran encontrado caracoles infectados exclusivamente con *F. hepatica*.

Por otro lado, existen técnicas moleculares para identificar a *F. hepatica* en el hospedador intermediario, como las de hibridización/transferencia de ARN y/o ADN y las de PCR (clásica, múltiple y en tiempo real). Las primeras no se utilizan en el campo ya que requieren el uso de moléculas radiactivas o quimioluminiscentes y de equipos sofisticados y costosos (Caron *et al.*, 2008). Las técnicas de PCR frecuentemente son consideradas las

[1] Prevalencia: Número de hospedadores infectados con una determinada especie de parásito divido por el número de hospedadores examinados para esa especie de parásito (Bush *et al.,* 1997).
[2] Intensidad: Número de individuos de una determinada especie de parásito en cada hospedador infectado (Bush *et al*., 1997).

mejores debido a su gran sensibilidad y especificidad (Kaplan *et al.*, 1997). Sin embargo, la técnica de PCR clásica no permite determinar la intensidad de la infección en el caracol ni la presencia de cercarias. Al mismo tiempo, las técnicas de PCR clásicas y múltiples, no brindan información sobre la viabilidad de los parásitos, ya que una señal positiva no permite saber si la infección podrá desarrollarse hasta la liberación de cercarias maduras (Caron *et al.*, 2008). Por último, la técnica de PCR en tiempo real permite calcular de manera confiable la intensidad de infección ya que el nivel de la flurorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado y este refleja la cantidad de parásitos presentes (Caron *et al.*, 2008).

En comparación con estas técnicas moleculares, el aplastamiento y la disección de los caracoles son métodos simples, de bajo costo, que permiten detectar en forma directa infecciones naturales y experimentales e identificar distintos estadios larvales del parásito (Dreyfuss *et al.*, 2005; Mage *et al.*, 2002). Sin embargo, el cálculo de la prevalencia y la intensidad de infección suele ser lenta, laboriosa y sólo puede realizarse en caracoles muy infectados.

En definitiva, para identificar a *F. hepatica* en su hospedador intermediario, existen distintas técnicas de análisis y cada una responde preguntas diferentes. Actualmente no existe una única técnica que sea simple, robusta, reproducible y lo suficientemente económica para usar en el campo. Por lo tanto, para estimar la prevalencia de la fasciolosis a nivel local, es imprescindible utilizar una combinación de técnicas, como por ejemplo las moleculares que detectan la invasión del parásito y las técnicas directas que detectan infecciónes exitosas y permiten identificar distintos estadios larvales del parásito.

1.2.3 Características de la infección por *F. hepatica* en el hospedador definitivo

La enfermedad causada por *F. hepatica* en el ganado y en los humanos se conoce como **fasciolosis** o distomatosis. La fasciolosis tiene una distribución cosmopolita, siendo más frecuente en la mayor parte de Europa incluyendo las islas con condiciones climáticas favorables, en las zonas montañosas del sur del continente Asiático, en el este y sur de África (Boray, 1985), en las regiones templadas y tropicales del continente Americano (Torgerson y Claxton, 1999), en Nueva Zelanda y en Australia (Boray, 1985).

Los mamíferos herbívoros que actúan como hospedadores definitivos de *F. hepatica* (sección 1.2.1) presentan distinto grado de susceptibilidad y de resistencia al parásito. Por

ejemplo, las ovejas son muy susceptibles y no presentan resistencia y el ganado bovino es menos susceptible y su resistencia frente al parásito es moderada. Esto determina que el desarrollo y los efectos de la infección sean diferentes en cada grupo, observándose por ejemplo mayor mortalidad en ovinos que en bovinos (Olaechea, 2007).

En el hospedador definitivo los daños o los cambios patológicos inducidos por *F. hepatica* son proporcionales al número de parásitos en los tejidos hepáticos, al tamaño de las fasciolas adultas y a la duración del período prepatente de la infección (entre la ingestión del parásito y la eliminación de huevos). La migración de las fasciolas juveniles en su camino hacia los ductos biliares produce hemorragias y esta pérdida de sangre provoca anemia y en algunos casos la muerte (Boray, 1985).
La fasciolosis puede presentarse en su forma aguda, subaguda o crónica. La fase aguda se caracteriza por la muerte súbita de los animales infectados cuando la carga parasitaria es muy alta. Los síntomas más evidentes son ascitis, hemorragia abdominal, ictericia, membranas empalidecidas, decaimiento y pérdida de estado. Los signos clínicos de esta fase se hacen evidentes entre la 6º y 10º semana post-infección (Behm y Sangster, 1999). La fase subaguda se caracteriza por una marcada letargia, anemia y pérdida de peso en los animales infectados. Se observa también una moderada cantidad de huevos del parásito en las heces del hospedador. Por último, la fase crónica se caracteriza por el desarrollo de edema ínter mandibular, ascitis, extenuación y una elevada cantidad de huevos del parásito en las heces del hospedador. Los signos clínicos de estas fases se hacen evidentes entre la 12º y 40º semana post-infección (Behm y Sangster, 1999).

Desde el punto de vista veterinario, es una de las enfermedades parasitarias de mayor importancia económica para el ganado doméstico, con pérdidas anuales estimadas en más de 2000 millones de dólares a nivel mundial (Mas-Coma *et al*., 1999). Éstas son producto del daño que produce el parásito en los animales e incluyen el decomiso de hígados, la muerte de los animales infectados, la reducción en la producción de carne y leche (Hope Cawdery *et al.*, 1977), la disminución en la calidad de la lana (Boray, 1981), los abortos y la reducción en la fertilidad en animales con altas cargas parasitarias (Dargie, 1987). Además, debido a que la fasciolosis se controla mediante la aplicación masiva de antiparasitarios, a estas pérdidas debe sumársele los gastos indirectos del uso de drogas (Boray, 1981). Se estima que en el mundo alrededor de 250 millones de ovejas y 300 millones de vacas se encuentran bajo riesgo de infección en zonas donde *F. hepatica* está presente (Boray, 1981).

En Argentina los registros de decomiso de hígados indican que la fasciolosis es la cuarta enfermedad de importancia veterinaria del ganado bovino (Oficina de estadística del SENASA). Es considerada una enfermedad endémica en el país y su distribución abarca las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Chubut, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, San Luís, Santa Cruz, Santa Fé y Tierra del Fuego (Oficina de estadística del SENASA, 2007). En los últimos 5 años, las mayores prevalencias se registraron en la Región Patagónica (6,8%), seguida de la Región Noreste (4,1%), Noroeste (2,2%), Cuyo (1,4%) y Pampeana (0,9%) (Oficina de estadística del SENASA, 2007) (Mas detalles en el Capítulo 2).

La población humana puede participar activamente en la transmisión, ya que el desarrollo del parásito muestra las mismas características que en el ganado bovino y ovino (Mas Coma *et al.*, 1999). Esta parasitosis es considerada por la OMS como una zoonosis emergente y constituye un problema de salud pública, ya que se estima que 2,4 millones de personas están infectadas en el mundo (Rim *et al.*, 1994). En los últimos años se incrementó la incidencia en 51 países de los 5 continentes (Mas Coma *et al.*, 1999). Sin embargo, el hecho de que esta parasitosis no sea de denuncia obligatoria sugiere que el número de casos podría ser mayor al estimado (Mas-Coma *et al*., 2005). En nuestro país, no se conoce la importancia de esta enfermedad ya que no existen registros sanitarios.

1.2.3.1 **Diagnóstico**

El diagnóstico de *F. hepatica* en el hospedador definitivo puede realizarse a partir de la necropsia de animales muertos y la observación de los parásitos adultos en el hígado y sus lesiones, y/o a partir del diagnóstico de laboratorio.

El diagnóstico de laboratorio, históricamente se realizó mediante la detección de huevos en materia fecal (diagnóstico coprológico). Existen varios métodos (flotación, sedimentación, tamización, etc) y todos se basan en la concentración de los huevos para su posterior visualización en lupa o microscopio (Dennis *et al.*, 1954; Kleiman *et al.*, 2005). Actualmente existen también métodos alternativos, como las técnicas moleculares y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (Duménigo y Villalvilla, 1998; Rognlie *et al.*, 1996), que se basan en la detección de ADN, antígenos o anticuerpos del parásito y son más sensibles que los métodos coprológicos, ya que pueden detectar infecciones tempranas causadas por juveniles que aún no alcanzaron la madurez sexual y que no liberan huevos, así como infecciones tardías con parásitos seniles. Sin embargo, los métodos moleculares e inmunológicos no proveen información sobre la cantidad de huevos liberados ni sobre la proporción de hospedadores definitivos que aportan huevos al ambiente. Estas variables

son importantes para la realización de estudios epidemiológicos, ya que la oferta de potenciales miracidios a las poblaciones locales de caracoles modelan la dinámica de la transmisión de *F. hepatica*.

1.2.4 Epidemiología de la fasciolosis

El estudio de la epidemiología de la fasciolosis en el ganado involucra los factores que afectan la prevalencia y la intensidad de la infección y como ésto impacta en los animales (Torgerson y Claxton, 1999). La epidemiología de la enfermedad depende de la susceptibilidad de las especies de hospedadores definitivos, dada por la resistencia natural y/o adquirida y por el estado nutricional, la edad y otros factores que condicionan la fisiología de cada especie y también de la presión de infección en el ambiente (Torgerson y Claxton, 1999). La presión de infección, a su vez, está fuertemente influenciada por factores abióticos, en particular por la temperatura y la humedad, que modulan la presencia y el desarrollo de los hospedadores intermediarios y el desarrollo del parásito dentro y fuera de éstos (Torgerson y Claxton, 1999). La epidemiología de la fasciolosis también depende de una gran variedad de factores topográficos, biológicos y de manejo ganadero (Boray, 1985).

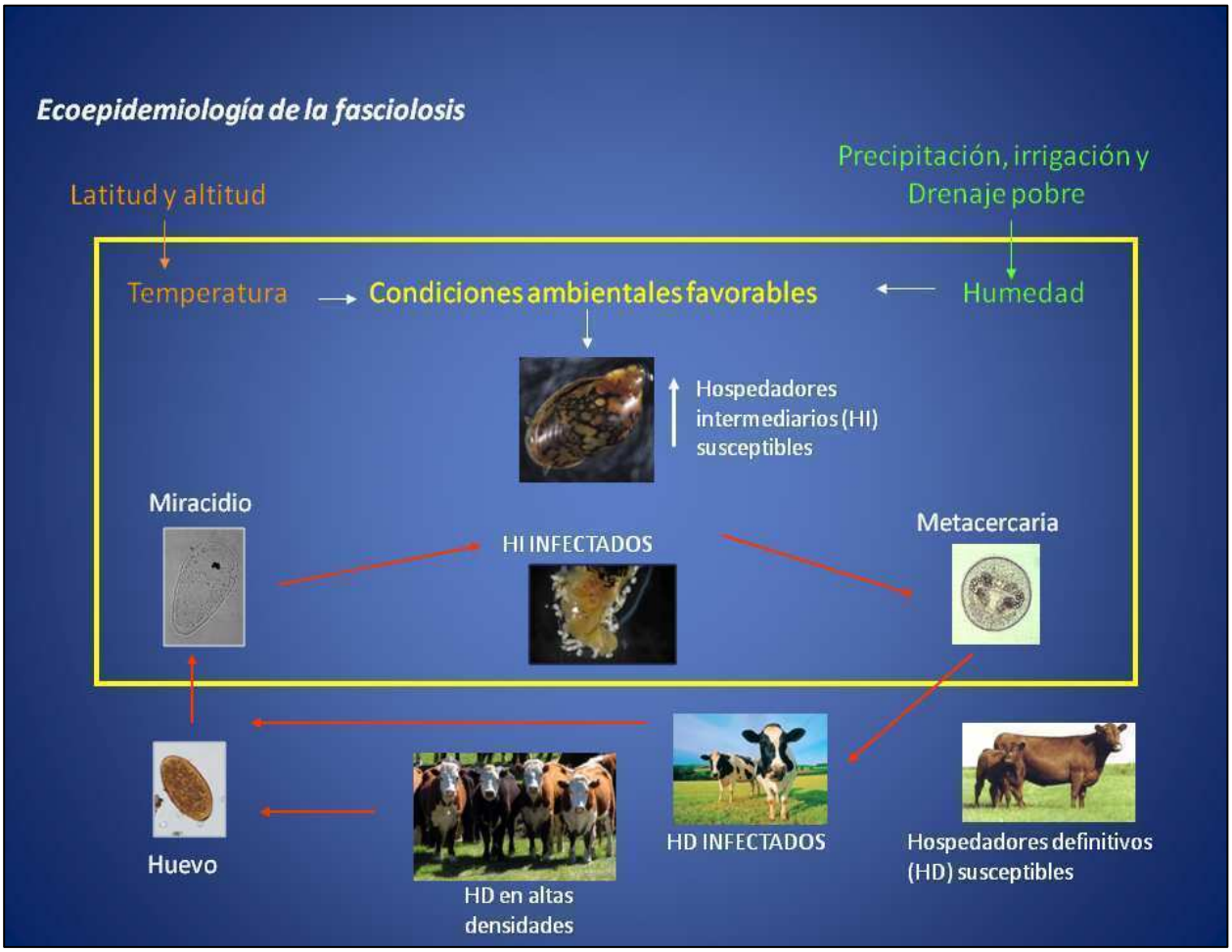
En la Figura 1.3 se muestran las interacciones de estos factores epidemiológicos. La latitud y la altitud determinan la **temperatura**. La temperatura media de la atmósfera disminuye 0,5ºC por cada grado que aumenta la latitud y por cada 100m de elevación en la altitud (Flores *et al.*, 2008). A su vez, las altas precipitaciones o el riego artificial en zonas con escasa pendiente o mal drenaje favorecen la acumulación de agua en el suelo. Cuando la temperatura oscila entre los 10ºC y 30ºC y hay suficiente **humedad** en el suelo se generan **condiciones favorables** para el establecimiento y el desarrollo de los caracoles de la familia Lymnaeidae, que actúan como hospedadores intermediarios de *F. hepatica* (Torgerson y Claxton, 1999). Estas condiciones permiten que los caracoles desarrollen poblaciones abundantes y persistentes en el tiempo. A su vez, los huevos de *F. hepatica*, eliminados por el ganado infectado, se desarrollan satisfactoriamente bajo éstas mismas condiciones ambientales, liberándose al ambiente gran cantidad de miracidios. Estos se ponen en contacto con las poblaciones abundantes de caracoles susceptibles y aumenta el número de caracoles infectados que luego emitirán cercarias que se enquistarán en la vegetación, contribuyendo a la contaminación de las pasturas y elevando la presión de infección para el ganado. Una gran cantidad de hospedadores definitivos susceptibles, ya sea por que tienen una resistencia innata pobre o una respuesta inmune deficiente, estará

en condiciones de infectarse y desarrollar exitosamente la infección. A su vez, la elevada carga ganadera por hectárea contribuirá a que muchos animales puedan infectarse y liberen gran cantidad de huevos al ambiente (Fig. 1.3).

En aquellas áreas donde la temperatura media oscila entre 10ºC y 37ºC, la transmisión se produce durante todo el año si hay humedad disponible en el terreno. En zonas sujetas a inviernos rigurosos, veranos muy cálidos o períodos de sequía, la transmisión está restringida a los meses más favorables (Torgerson y Claxton, 1999).

Las medidas para controlar esta parasitosis dependen de un profundo conocimiento de la epidemiología de la fasciolosis a nivel local. Este conocimiento permitirá diseñar estrategias de control específicas que permitan reducir la transmisión del parásito, minimizando la prevalencia y la intensidad de la enfermedad en animales con riesgo de adquirirla (Torgerson y Claxton, 1999).

Figura 1.3: Epidemiología de la fasciolosis.



1.3. Objetivos de la Tesis

Los **objetivos generales** de esta tesis son:

1) **Describir la dinámica de transmisión de *Fasciola hepatica* en el norte de la Provincia de Corrientes,**

La presencia de una gran cantidad de bovinos infectados con *F. hepatica* en el norte de la Provincia de Corrientes (Moriena *et al.*, 1999) y la falta de estudios epidemiológicos integrales sobre esta parasitosis en la zona, motivó la realización de este trabajo para conocer la dinámica de transmisión local, analizando en forma simultánea al parásito, a los hospedadores (definitivo e intermediario), al tipo de ambiente y a las variables bióticas y climáticas.

El norte de la Provincia de Corrientes pertenece a una región con clima **subtropical** y presenta una topografía particular ya que gran parte de su superficie está ocupada por distintos tipos de humedales, como **Bañados, Esteros** y **Malezales**. Estas dos características de la zona de estudio subrayan la importancia de estudiar la dinámica de transmisión de *F. hepatica* porque, por un lado, no se conoce el patrón de transmisión de *F. hepatica* en regiones de Argentina con clima subtropical, ya que los únicos estudios epidemiológicos realizados en el país se desarrollaron en la Patagonia, una región con clima árido frío (Kleiman *et al.*, 2007; Rubel *et al.*, 2005), y por el otro, porque nunca se había estudiado la dinámica de transmisión en este tipo de humedales, que seguramente son ambientes aptos para el desarrollo de los estadios de vida de *F. hepatica* y de sus hospedadores intermediarios (caracoles de la familia Lymnaeidae).

2) **Identificar los factores que influyen en la transmisión de *Fasciola hepatica*, y**
3) **Elaborar una propuesta de control de la transmisión adecuada a las características epidemiológicas locales.**

La dinámica de transmisión de *F. hepatica* está fuertemente influenciada por factores bióticos (comunidad de gasterópodos) y abióticos (temperatura, humedad, tipos de ambientes) que modulan la dinámica poblacional de los hospedadores intermediarios y el desarrollo del parásito dentro y fuera de éstos. La importancia relativa de cada uno de estos factores varía según la región geográfica y sus

características climáticas y topográficas. Por lo tanto, resulta fundamental estudiar y conocer las particularidades de la transmisión en el norte de la Provincia de Corrientes para diseñar e implementar medidas de control efectivas basadas en las características propias de la transmisión en la zona.

Los **objetivos específicos** y las **hipótesis** planteadas en esta tesis se describen detalladamente en cada capítulo, según corresponda.

1.4. Estructura de la tesis

En el **capítulo 2** se describen los criterios adoptados para la selección del área de estudio y sus características ambientales y climáticas.

En el **capítulo 3** se describen los materiales y métodos aplicados a lo largo de todo el estudio.

En el **capítulo 4** se identifica morfológicamente a la especie de lymneido presente en la zona de estudio.

En el **capítulo 5** se describe la abundancia, la estructura, la dinámica poblacional y los aspectos biológicos y ecológicos más sobresalientes de este caracol en los distintos humedales del norte de la Provincia de Corrientes y su relación con las variables climáticas y ambientales.

Finalmente, en el **capítulo 6** se describe la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en la zona de estudio teniendo en cuenta la prevalencia de infección en el hospedador definitivo, la prevalencia de infección en el hospedador intermediario, las variables ambientales y el manejo sanitario de los animales. En base a estos resultados obtenidos se propone un programa específico para controlar la fasciolosis en la zona de estudio.

Capítulo 2

CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE

2.1. Selección del área de estudio

La primera referencia en Argentina sobre la fasciolosis data de 1888, cuando se la reconoce como un problema para el ganado ovino en la Provincia de Buenos Aires (Wernicke, 1888). En aquella época, sólo se conocía que el ganado infectado albergaba en su hígado y canales biliares las formas adultas del parásito, reconocidas como pequeñas "sanguijuelas" que vivían en aguas estancadas y eran consumidas por el ganado al pastar en zonas anegadas. Wernicke (1888) tuvo la certeza de que las larvas de *Fasciola hepatica* se desarrollaban en caracoles, pero no logró encontrar ejemplares infectados. La primera descripción completa y detallada del ciclo de vida de *F. hepatica* fue realizada por Sivori (1893, citado en Bacigalupo, 1934) y el hallazgo de *Lymnaea viatrix* como hospedador intermediario en nuestro país fue realizado por primera vez por Bacigalupo (1934). *F. hepatica* fue introducida al nuevo mundo desde Europa después de la colonización (Wernicke, 1888), momento a partir del cual se dispersó, afectando al ganado doméstico, al silvestre y al ser humano (Olaechea, 2007). Actualmente, ésta parasitosis se encuentra distribuída en todo el territorio Argentino, desde el extremo norte hasta el centro de la Patagonia, y desde la precordillera hasta las costas del Atlántico.

Para analizar los niveles de infección de esta zoonosis a nivel nacional y regional durante los 5 años previos al comienzo del estudio (1997-2002) se analizaron los registros del número de hígados bovinos decomisados en mataderos oficiales, suministrados por la división de estadística del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Para interpretar los resultados a nivel regional, se dividió al país en las siguientes regiones: **Noroeste** (Jujuy, Salta, La Rioja, Tucumán, Catamarca y Santiago del Estero), **Noreste** (Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes y Entre Ríos), **Cuyo** (San Juan, San Luís y Mendoza), **Pampeana** (Córdoba, Santa Fé, Buenos Aires y La Pampa) y **Patagónica** (Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego).

La prevalencia de fasciolosis a nivel nacional, para el período 1997-2002, osciló entre 0,7 y 1,1% (Tabla 2.1). Teniendo en cuenta que la fasciolosis es la cuarta enfermedad en importancia para el ganado doméstico en el país (SENASA), resulta llamativa la baja

prevalencia registrada a escala nacional. Estos valores podrían estar subestimando la prevalencia real, ya que los datos del SENASA sólo reflejan la situación de los mataderos nacionales, y no tienen en cuenta lo que sucede en los establecimientos Provinciales y municipales, donde se faenan gran cantidad de animales.

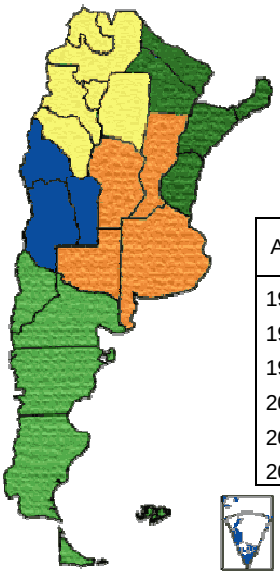


Tabla 2.1: Prevalencia nacional y regional en ganado bovino, calculada a partir del número de hígados decomisados por distomatosis en frigoríficos nacionales registrados por el SENASA en el período 1997-2002. Ref: P= Prevalencia

	Total País		Regiones									
			NOROESTE		NORESTE		CUYO		PAMPEANA		PATAGÓNICA	
Año	Decomiso	P (%)	Decomiso	P (%)	Decomiso	P (%)	Decomiso	P (%)	Decomiso	P (%)	Decomiso	P (%)
1997	114.559	1,1	759	0,7	16.600	2,9	4.557	1,3	77.275	0,6	15.368	9,6
1998	89.118	0,9	1.092	1,3	12.480	2,9	4.326	1,7	59.837	0,7	11.383	8,0
1999	85.362	0,8	845	1,1	14.653	3,3	4.976	1,5	51.127	0,5	13.761	8,4
2000	78.114	0,7	934	1,1	10.998	2,4	3.897	1,1	47.987	0,5	14.298	7,5
2001	66.662	0,7	1.094	1,5	10.577	2,3	3.177	1,2	43.263	0,5	8.551	5,0
2002	85.949	0,9	2.463	2,5	9.135	2,5	3.755	1,2	60.193	0,7	10.403	7,0

A nivel regional, se observan diferencias muy marcadas, tanto en la contribución de cada región al número de animales faenados y decomisados (Tabla 2.2), como en los niveles de infección (Tabla 2.1). La región Pampeana aporta alrededor del 90% de los animales faenados y entre el 60-70% de los animales decomisados (Tabla 2.2), pero presenta los valores de prevalencia más bajos del país (0,5-0,7%) (Tabla 2.1). Contrariamente, la región Patagónica contribuye muy poco a la faena nacional (1,5-1,8%) y aporta alrededor del 15% de los animales decomisados (Tabla 2.2), pero presenta las prevalencias más altas del país (5,0-9,6%) (Tabla 2.1). La región de Cuyo presenta niveles de infección bajos (1,1-1,7%) (Fig 2.1) a pesar de su relativa importancia en la proporción de animales faenados y decomisados (2,6-5,0%) (Tabla 2.2) . El Noroeste es la región con la menor contribución a la faena y al decomiso nacional (0,7-1,6%) y la que presenta la menor prevalencia de fasciolosis (0,7-1,5%), salvo en 2002, donde todos los valores aumentaron considerablemente (Tabla 2.1 y 2.2). Finalmente, la región Noreste tiene una importancia particular, ya que es la segunda región en importancia, tanto en el aporte a la faena y el decomiso nacional (3,9-5,4% y 10,6-17,2%, respectivamente; Tabla 2.2) como en los niveles de infección de *F. hepatica* (2,3-3,3%) (Tabla 2.1). Esto significa que existen en esta zona gran cantidad de animales infectados con el parásito y focos de transmisión bien

establecidos, donde se encuentran las condiciones propicias para el desarrollo del ciclo de vida del parásito y de sus hospedadores.

Tabla 2.2: Aportes de cada región a la faena (faena x región/ faena nacional) y al decomiso nacional (decomiso x región/ decomiso nacional) para el período 1997-2002 (SENASA).

	País		Regiones									
			NOROESTE		NORESTE		CUYO		PAMPEANA		PATAGÓNICA	
Año	Faena	Decomiso	% Faena	% Decomiso	% Faena	% Decomiso	% Faena	% Decomiso	% Faena	% Decomiso	% Faena	% Decomiso
1997	10.787.815	114.559	1,0	0,7	5,4	14,5	3,2	4,0	89,0	67,5	1,5	13,4
1998	9.480.262	89.118	0,9	1,2	4,5	14,0	2,6	4,9	90,5	67,1	1,5	12,8
1999	10.434.127	85.362	0,7	1,0	4,3	17,2	3,1	5,8	90,3	59,9	1,6	16,1
2000	10.729.446	78.114	0,8	1,2	4,3	14,1	3,2	5,0	90,0	61,4	1,8	18,3
2001	9.777.845	66.662	0,8	1,6	4,8	15,9	2,7	4,8	90,1	64,9	1,8	12,8
2002	9.492.900	85.949	1,0	2,9	3,9	10,6	3,3	4,4	90,2	70,0	1,6	12,1

Las Provincias que integran la región Noreste difirieron en sus niveles de infección durante el período 1997-2002, siendo Misiones la que presentó la mayor prevalencia (5-11,1%) y el Chaco la menor (0-1,3%). En la Provincia de Corrientes, la prevalencia osciló entre 0,9 y 3,7% para el mismo período, aunque hubo dos años sin información (1999 y 2000). Estos valores, calculados a partir de datos de decomiso de hígado bovinos en mataderos nacionales (SENASA), difieren de los registrados en mataderos Provinciales y municipales, registrados por la dirección de Ganadería de la Provincia de Corrientes. En la década del 70´, la enfermedad estaba circunscripta a unos pocos Departamentos del oeste de la Provincia y las prevalencias oscilaban entre 9 y 30% (Lombardero *et al.*, 1979b). Estudios posteriores demostraron una ampliación del área de distribución inicial de ésta enfermedad hacia zonas donde la presencia de *F. hepatica* no era habitual y un aumento en los niveles de infección, que alcanzaron valores de hasta 32,7% (Moriena *et al.*, 2000).

El Departamento de Berón de Astrada, está localizado al norte de la Provincia y es una de las zonas donde la presencia de *F. hepatica* se registró recién en la década del 90´. En 1997, en un matadero de la capital Provincial, se registró el primer grupo de bovinos infectados procedente de la localidad de Berón de Astrada, con una prevalencia del 2,6% (Moriena *et al.*, 1999). Un estudio realizado entre 2000 y 2001 en un establecimiento de dicha localidad, detectó prevalencias de hasta 84,6% en ganado bovino de la zona, nacido y criado localmente (Moriena *et al.*, 2001). Este último resultado resalta la importancia de ésta zona en la transmisión de *F. hepatica* y confirma la existencia de una nueva zona enzoótica para la fasciolosis.

Figura 2.1: Climas de la República Argentina.

De acuerdo a lo mencionado en el Capítulo 1, la dinámica de transmisión de la fasciolosis tiene fuertes determinantes ambientales que modelan y generan patrones de transmisión particulares en cada región. La Argentina, por su gran amplitud longitudinal y latitudinal (desde los 21º 46' hasta los 55º 58' S), presenta una gran diversidad climática, que incluye los climas cálido, templado, árido y frío (Fig. 2.1). Por lo tanto, es de esperar que la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en las distintas zonas endémicas del país sea diferente y se vea afectada por distintos factores.

En nuestro país, son pocos los trabajos relacionados con el estudio de la fasciolosis, y en su gran mayoría éstos abordan el tema desde una perspectiva veterinaria, analizando sólo lo que ocurre en los hospedadores definitivos de importancia económica (e.g. Dwinger *et al.*, 1982; Lombardero *et al.*, 1979b; Moriena *et al.*, 2001; Moriena *et al.*, 2007; Olaechea, 2007). En consecuencia, los trabajos que abordan el estudio de ésta parasitosis desde una perspectiva epidemiológica, analizando todos los factores involucrados en la dinámica de transmisión (hospedadores definitivos, hospedadores intermediarios, parásito, ambiente, clima, etc.) son escasos (Kleiman *et al.*, 2007; Rubel *et al.*, 2005). Entre ellos, se puede destacar el estudio sobre los factores involucrados en el ciclo de transmisión de F*. hepatica*, realizado en los valles cordilleranos patagónicos de la Provincia de Chubut, por el ser el más actual y completo del país (Kleiman *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en dicho trabajo, reforzaron la necesidad de estudiar la dinámica de *F. hepatica* en otra zona endémica, con características climáticas y topográficas contrastantes (Fig 2.1), para identificar los factores que la determinan, comparar los patrones de transmisión y obtener una visión global e integrada de esta zoonosis a nivel nacional.

La región Noreste se presenta como una zona ideal para realizar un estudio epidemiológico de la fasciolosis, ya que es un área endémica para la enfermedad, es la segunda región en importancia a nivel de prevalencias de infección y presenta

características climáticas y fisonómicas completamente opuestas a la región Patagónica. Por todo lo expuesto, la zona elegida para realizar un estudio epidemiológico integral de la fasciolosis, donde se estudiarán todos los factores involucrados en la dinámica de transmisión, es la localidad de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes.

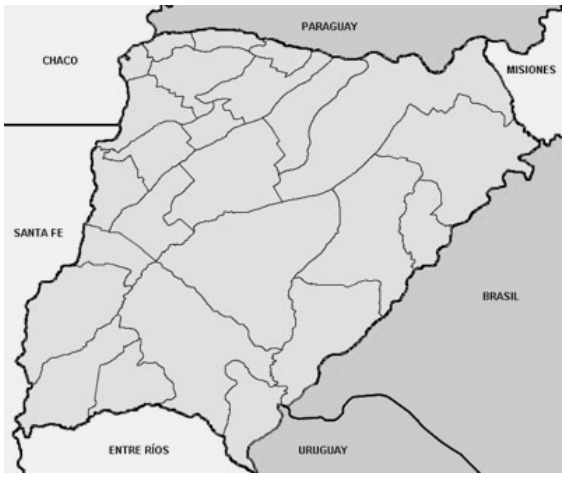
2.2. Caracterización del área de estudio

2.2.1. Provincia de Corrientes

La **Provincia de Corrientes** integra la región Noreste de Argentina (NEA) (Fig. 2.2) y limita al norte y al oeste con el Río Paraná, que la separa de Paraguay y de las Provincias de Chaco y Santa Fe; al este con el río Uruguay, que la separa de Uruguay y de Brasil; al sur con los ríos Guayquiraró y Mocoretá y los arroyos Basualdo y Tunas que la separan de la Provincia de Entre Ríos. Al nordeste los arroyos Itaembé y Chimiray junto con un tramo de 30 km de límite seco, la separan de la Provincia de Misiones (Fig. 2.3).

Figura 2.2: Regiones de Argentinas

Figura 2.3: Provincia de Corrientes, Argentina.



La Provincia de Corrientes tiene una superficie aproximada de 88.200 km^2. El territorio forma parte de la cuenca sedimentaria del Paraná originada en el paleozoico y fue afectada a lo largo de su evolución por diferentes procesos geodinámicos y morfoclimáticos. La Provincia no presenta diferencias marcadas en elevaciones topográficas, con máximos que

no superan los 200 m.s.n.m en el sector noreste y los 35 m.s.n.m en el sudoeste. Esta baja amplitud lleva a definirla como una llanura (Escobar *et al.*, 1990). La escasa pendiente, la naturaleza del sustrato geológico y la acción de la biomasa, que entorpece el movimiento del agua, provocan un drenaje deficiente que determina la presencia de vastas áreas inundables o inundadas (lagunas, esteros, bañados), ya sea por agua de lluvia o por desborde de fuentes de agua. Estas áreas cubren cerca del 45% de la superficie de la Provincia (Carnevali, 1994).

La Provincia de Corrientes presenta un **clima** subtropical (ó cálido-templado) húmedo sin estación seca (Escobar *et al.*, 1990). Los determinantes más importantes del clima son la temperatura, el régimen de lluvias y el balance hídrico (Carnevali, 1994). La **temperatura** media anual varía entre 21,5ºC al norte y 19,5ºC al sur, la temperatura media del mes más frío (julio) varía entre 16 y 13ºC y la media del mes más cálido (enero) entre 27 y 26ºC. Estas temperaturas invernales y estivales relativamente elevadas y su escasa variación anual definen al clima correntino como subtropical. En verano se registran máximas absolutas de 42,5 a 46ºC, según zonas, y en invierno mínimas absolutas de -1 a -5ºC. Sin embargo las heladas son poco frecuentes, con 320 a 360 días libres de heladas (Carnevali, 1994). Las **precipitaciones** son abundantes, frecuentes e irregulares, superando los 1500mm anuales en el NE y descendiendo gradualmente hasta menos de 1000mm en el SO. La época más lluviosa es el otoño y la más seca el invierno, con un máximo secundario en primavera y un mínimo secundario en verano. Por la precipitación registrada no se puede hablar de estaciones secas ni de sequías de importancia, aunque períodos de escasez de lluvias ocurren cada 4 a 6 años, según la zona, y de real importancia cada 10 años (Carnevali, 1994). El **balance hídrico** es positivo en toda la Provincia durante todo el año. Los mayores excesos de agua se observan al noreste mientras que hacia el oeste aumenta la probabilidad de déficit hídrico, especialmente en verano (Escobar *et al.*, 1990). A partir de valores estacionales promedios de temperatura media, precipitación y evapotranspiracion potencial (ETP) y real (ETR) registrados en diversas estaciones meteorológicas, se observa que en verano la precipitación es menor que la ETP y ETR provocando un déficit hídrico y un mayor consumo del agua del suelo. En otoño se produce la reposición del agua del suelo debido a las lluvias intensas y a un menor consumo de agua, y en primavera son normales los excesos de agua (Carnevali, 1994).

El clima es reconocido como el factor más influyente en la distribución de la vegetación y en el desarrollo de sus diversas formas (Carnevali, 1994). Cabrera y Willink (1973) se basaron en características de la vegetación y de la fauna para dividir el territorio de América latina en regiones biogeográficas que a su vez pueden subdividirse en dominios, Provincias

y Distritos. Según estos autores, en la Provincia de Corrientes se distinguen tres unidades biogeográficas: el Distrito Oriental Chaqueño (Provincia Chaqueña), el Distrito del Ñandubay (Provincia del Espinal) y el Distrito de los Campos (Provincia Paranaense). Los dos primeros pertenecen al Dominio Chaqueño y el último al Dominio Amazónico. El Distrito Oriental Chaqueño abarca llanuras y sierras de poca elevación con predominio de bosque xerófilo y un estrato herbáceo de gramíneas, cactáceas y bromeliáceas terrestres. También existen palmares, sabanas y estepas arbustivas. La especie arbórea más característica es el quebracho colorado (*Schinopsis balansae*). En el Distrito de los Campos predominan las sabanas de gramíneas con arbustos y arbolitos aislados y en el Distrito del Ñandubay el bosque xerófilo bajo y con pocas especies y palmares, estepas graminosas y estepas halófitas. Las especies arbóreas predominantes son el Ñandubay (*Prosopis algarrobilla*) y el algarrobo (*Prosopis nigra*) (Cabrera y Willink, 1973). Posteriormente, Carnevali (1994) estudió las unidades de vegetación o unidades de paisaje de la Provincia de Corrientes e identificó 2 grandes regiones naturales delimitadas por la laguna del Iberá: la región occidental (divida en 4 subregiones: 1.I.A, 1.I.B, 1.II.A y 1.II.B) y la región oriental (divida en 4 subregiones: 2.III, 2.IV, 3.V y 3.VI) (Fig. 2.4). Estas regiones se relacionan con los territorios fitogeográficos como se muestra en la Tabla 2.3.

Figura 2.4: Regiones naturales de la Provincia de Corrientes. Fuente: Carnevali, 1994.

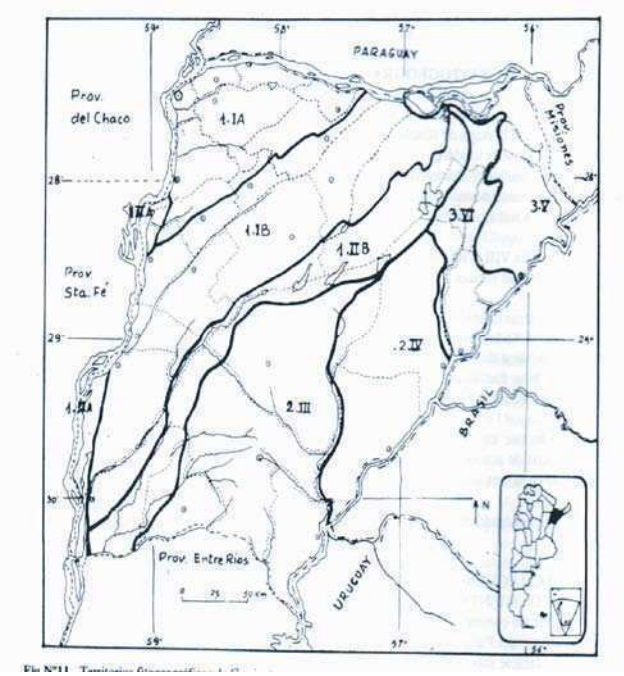


Tabla 2.3: Regiones naturales y territorios fitogeográficos de la Provincia de Corrientes

CODIGO	REGION NATURAL*	TERRITORIO FITOGEOGRAFICO**
1.I.A	**Gran Región occidental** Albardón y planicie subcóncava del Noroeste	**Dominio Chaqueño** **Distrito Oriental Chaqueño** **SubDistrito Correntino** **Sector** del parque chaqueño-Correntino de *Schinopsis balansae* del albardón y planicies subcóncavas del NW
1.I.B	Lomadas arenosas, planicies y depresiones	**Sector** del parque mesopotámico de sabanas graminosas, palmares de *Butia yatay* y bosques de las lomas y planicies embutidas
1.II.A	Valle actual del Paraná	**SubDistrito Hidro-higrofito** **Sector** fluvio-insular paranense con pajonales, pirizales y bosques riparios
1.II.B	Depresión Iberana	**Sector** de la depresión iberana con pirizales, pajonales y bosques xerohalófilos
2.III	**Gran Región Oriental** Cuchillas mesopotámicas	**Distrito del Ñandubay** **SubDistrito** de las sabanas parque de espinillo y sabanas abiertas en las colinas de erosión escalonadas del centro-sur
2.IV	Malezales de Iby-baí	**SubDistrito** de los malezales, sabanas y pajonales de la planicie sedimentaria del este
3.V	Colinas y Llanuras del Noreste	**Dominio Amazónico** **Distrito de los campos** **SubDistrito** de las sabanas secas de las planicies subestructurales del NE
3.VI	Malezales de Iby-baí	**SubDistrito** de los malezales, sabanas y pajonales de la planicie sedimentaria del este

Fuente: Carnevali, 1994

* División propuesta por Capurro *et al*., 1973-1985
** División propuesta por Cabrera y Willink, 1973

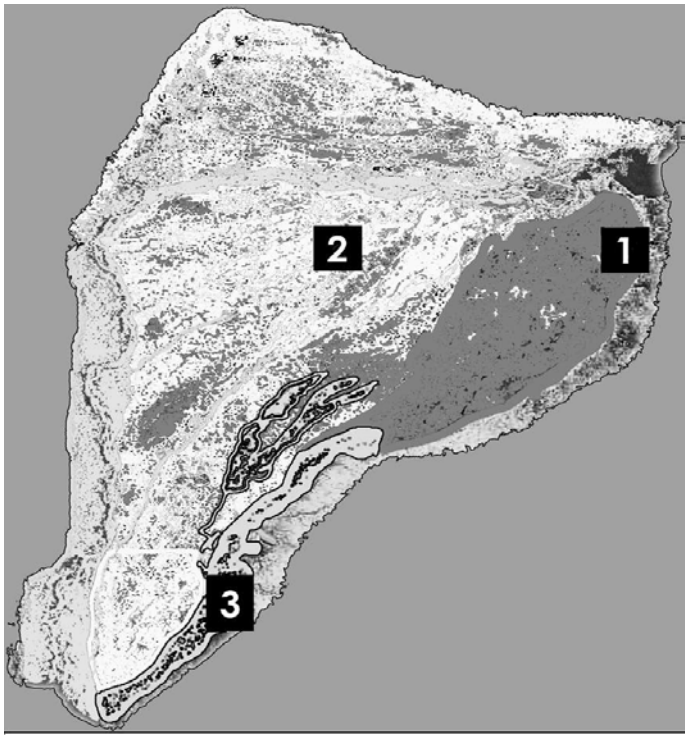
En total, Carnevali (1994) reconoce y describe 74 unidades de paisaje (38 en el Distrito oriental chaqueño, 10 en el Distrito del Ñandubay y 26 en el Distrito de los campos). Excede al objetivo de este trabajo la descripción de cada una de ellas. Sólo se describirá más adelante la correspondiente a la del área de estudio (1.I.A).

La fisonomía de Corrientes está fuertemente influenciada por las grandes cuencas hidrológicas que la rodean (Río Paraná y Río Uruguay y sus afluentes) y por las lagunas, bañados y esteros que abundan en todo el territorio. Estos últimos no integran un sistema hidrográfico organizado, pero se destacan por conformar el área con mayor dinamismo de la región. Las lagunas, bañados y los esteros son alimentados por las lluvias y ocupan un área de más de 20.000 km^2, que representan el 22,5% del territorio Provincial. Los esteros correntinos más importantes son los del Iberá, Maloyas, Batel y Santa Lucía.

2.2.2. Macrosistema del Iberá

La Región del Iberá comprende unos 45.000 km^2 localizados entre las latitudes 27º40' y 29º 20' S y las longitudes 56º38' y 59º25' O, abarcando gran parte del territorio Correntino (Fig. 2.5). La región está formada por un complejo de ecosistemas con predominio de ambientes palustres (esteros y bañados) que interconectan extensos lagos poco profundos, unidos por cursos de agua (Neiff, 2004).

Figura 2.5: Región del Iberá: **1.** Grandes lagunas y esteros del este, **2**. NW-Iberá/Ñeembucú, **3.** Cursos y bañados fluviales



Es una de las principales fuentes superficiales de agua limpia de la Argentina y en ella viven más de 4.000 especies vegetales y animales (Poi de Neiff, 2003). En la región del Iberá

están representados los nueve tipos de humedales que caracterizan a los sistemas de anegamiento[3] y de inundación[4] en Sudamérica (Neiff, 2004). Pero….. ¿Qué es exactamente un humedal?

El término **humedal** engloba a ambientes acuáticos muy diversos que en la Argentina son conocidos como lagos, lagunas, cañadas, esteros, bofedales, pantanos, turbales, ríos y arroyos, además de muchos otros nombres regionales (Canevari *et al.*, 1999). En la bibliografía existen diferentes definiciones, algunas relacionadas con el manejo y otras con criterios ecológicos. Kandus *et al.* (2006) definen a los humedales como áreas que permanecen en condiciones de anegamiento o inundación o con suelos saturados con agua durante períodos de tiempo considerables; el aporte de agua puede ser de origen marino, fluvial, pluvial o freático; el régimen hidrológico puede ser variable en cuanto a la frecuencia, intensidad y duración del período de inundación o anegamiento. A su vez, el régimen hidrológico es reconocido como el principal factor condicionante de las propiedades estructurales y funcionales de los ecosistemas de humedal (Mitsch y Gosselink, 2000). Los criterios diagnósticos más utilizados para la identificación y delimitación de humedales también tienen en cuenta la presencia de vegetación adaptada al exceso de agua y a la alternancia de situaciones de exceso y déficit (Keddy, 2000) y la presencia de suelos hídricos o con señales de hidromorfismo (Cowardin *et al.*, 1979). Mitsch y Gosselink (2000) plantean que, a pesar de la variedad de humedales que existen, todos poseen estas 3 características: presencia de agua, ya sea en la superficie o en la zona de las raíces, que genera un suelo saturado; suelos característicos producto de la lenta descomposición de materia orgánica y una biota (vegetación y animales) adaptada a suelos saturados.

Según la convención Ramsar, o convención sobre los humedales[5], éstos son: "*Extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros*". Esta definición es aún más general e incluye todas las aguas interiores y una franja de costas marinas.

Mas allá de la diversidad de definiciones que puedan existir debido a la falta de acuerdo en una definición universal (Malvárez, 2004) queda claro que los humedales no son simplemente ecotonos (o áreas transicionales) entre sistemas acuáticos y terrestres, ya que poseen características estructurales y funcionales propias (Kandus *et al.*, 2006; Neiff, 2004).

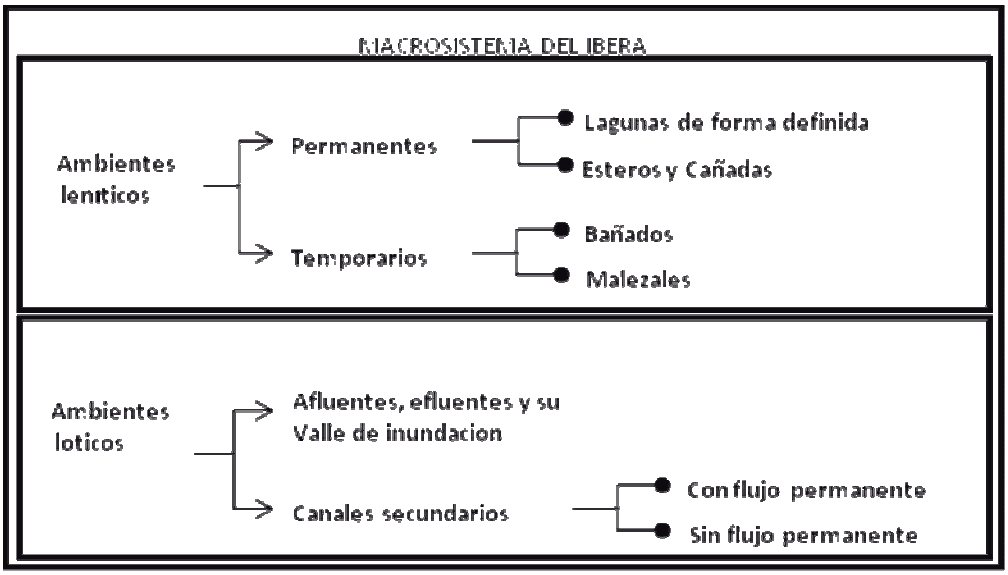
[3] Anegamiento: acumulación de agua por precipitaciones locales (en ingles: waterlogged)
[4] Inundación: acumulación de agua por desborde de ríos (en ingles: flooded)
[5] La Convención sobre los Humedales es un tratado intergubernamental aprobado el 2 de febrero de 1971 en la ciudad iraní de Ramsar, relativo a la conservación y el uso racional de los humedales (Humedales de la Argentina 2007)

Los humedales son sistemas altamente productivos, con una gran biodiversidad y son un componente fundamental en el ciclo del agua. Los humedales brindan numerosos beneficios a la sociedad a través de sus *recursos* (agua, productos forestales, zonas para ganadería, zonas para acuicultura, explotación de vida silvestre, producción de energía, etc), *funciones* (provisión de agua, regulación de inundaciones y sequías, prevención de intrusión de agua salada, protección contra fenómenos naturales, retensión de sedimentos y nutrientes, remoción de tóxicos, estabilización de microclimas, retención de carbono, turismo y transporte) y *atributos* (diversidad biológica, importancia sociocultural) (Canevari *et al.*, 1999).

La gran extensión de la Argentina y su variación latitudinal y altitudinal determinan la existencia de una gran variedad y riqueza de humedales (Canevari *et al.*, 1999; Malvárez, 1999). El **Macrosistema del Iberá**, con una superficie de 12.300 Km^2 y ubicado en el extremo este de la región del Iberá (Fig. 2.5), constituye el mayor humedal de agua dulce de la Argentina. Iberá significa “agua que brilla” y es la palabra de la lengua Guaraní con que los aborígenes designaron a las enormes lagunas comprendidas en un extenso paisaje palustre. Iberá es el nombre con que hoy se conoce a una de las lagunas principales del macrosistema (Neiff, 2004). El Macrosistema del Iberá constituye un complejo de humedales de agua dulce, con régimen de anegamiento de alta recurrencia estacional e interanual, cuyas aguas escurren hacia el río Corriente para finalmente desembocar en el río Paraná. La escasa pendiente de la región, la depresión dada por su ubicación entre tierras más altas y los obstáculos naturales que dificultan el drenaje de las aguas hacia su única salida, el río Corriente, posibilitan la existencia de una cubierta permanente de agua en algunos sectores, vastas superficies sujetas a inundaciones y anegamientos temporarios en otros y elevaciones muy bien drenadas. Esta diversidad de relieves permite la existencia de distintos tipos de ambientes, cuyas características más salientes han sido resumidas por Neiff (2003a). El autor clasifica los cuerpos y cursos de agua del Macrosistema del Iberá en ambientes leníticos (agua quietas) y ambientes lóticos (aguas corrientes) (Fig. 2.6).

Las ***lagunas*** de superficie bien definida son ambientes leníticos permanentes y pueden dividirse en pequeñas y grandes, las cuales difieren no solo en el tamaño sino en el régimen de alimentación de aguas y en las características físicas y químicas. Las *lagunas pequeñas* poseen forma redondeada, con diámetros entre 30 y 500 m y una profundidad que varía entre 1,5 y 4 m. A pesar de que la fluctuación estacional del nivel de agua no supera los 50 cm se distinguen dos fases contrastantes: períodos de aislamiento de los cuerpos de agua (en general en años con poca precipitación) y períodos de anegamiento en los cuales se producen flujos horizontales de intercambio de nutrientes y organismos entre lagunas,

Figura 2.6: Cursos y cuerpos de agua del Macrosistema del Iberá. Fuente: Neiff, 2003.



entre éstas y los bañados y esteros, y entre éstas y los arroyos y ríos, como el Batel y el Corrientes, afluentes del Río Paraná. El agua de las pequeñas lagunas es transparente, neutra a ligeramente ácida y con baja salinidad.

La forma de las *grandes lagunas* varía desde subrredondeada o irregular (lagunas Galarza, Luna, Trin, Naranjito, etc.) a elongadas con su eje mayor paralelo al eje de mayor escurrimiento de agua (lagunas Fernández, Medina, Iberá, Paraná) (Neiff, 2003a). Estas lagunas son muy dinámicas ya que suelen estar enmarcados por extensos mantos de vegetación anfibia propia de los esteros que por momentos se abren para dar a lugar a espejos de agua definidos. Los espejos de agua no tienen un borde definido pero mantienen su forma gracias a un embalsado (isla flotante constituida por vegetación palustre) firme de más de un metro de espesor que flota en el mismo ambiente. En general las aguas suelen presentar variaciones diarias y estacionales del pH que oscilan entre 5,5 y 7,5.

Los ***esteros*** y ***cañadas*** son ambientes leníticos permanentes. Si bien los términos han sido usados en forma autónoma, no existen mayores diferencias para distinguirlos a nivel ecológico. Vulgarmente el término "*estero*" se ha usado para designar grandes extensiones que no ofrecen delimitación visual, anegadas en forma permanente, aunque con fluctuaciones en el nivel de agua que pueden, ocasionalmente, dejar el suelo descubierto; son alimentados por agua de lluvia, lo que genera un régimen de fluctuación hidrométrica gradual con una muy lenta circulación del agua debido a la escasa pendiente. El agua de los esteros tiene mayor salinidad que las lagunas, el pH es ácido (4-6), el color es castaño-castaño oscuro, con baja concentración de oxigeno disuelto y estratificación térmica (Neiff, 2003a).

Los "*esteros*" pueden definirse como: *Extensos paisajes densamente vegetados con dominancia de plantas palustres (geófitos), de pendiente muy escasa, que presentan depresiones con agua estancada en forma permanente o semi permanente y hasta lagunas densamente vegetadas, con alta producción de plantas acuáticas, que se descomponen lentamente, dando origen a la formación de suelos con horizonte orgánico superficial. En los sitios deprimidos del paisaje hay tendencia a la formación de turba con la peculiaridad de estar originada en la senescencia de plantas vasculares (y no musgos). Hay permanente deficiencia de oxígeno disuelto y abundante materia orgánica particulada y disuelta. El agua tiene carácter ácido permanente, transparencia alta, color castaño y carece de materiales inorgánicos suspendidos.*

Dentro de los ambientes leníticos temporarios del Macrosistema del Iberá se pueden distinguir dos tipos de ambientes bien diferenciados, los bañados y los malezales. Los ***bañados*** son interfases entre las áreas palustres de estero y la tierra firme. Cronológicamente son paisajes muy recientes que se originan por la pérdida de la capacidad de almacenamiento de agua debido a la colmatación progresiva de los lagos, lo que conduce al encharcamiento de nuevas áreas. La gran mayoría de los bañados en el Iberá son alimentados por lluvias locales que producen el encharcamiento temporal del suelo. No hay aportes alóctonos de nutrientes ni de sedimentos (Neiff, 2003a). Son los humedales más ricos en fauna de vertebrados acuáticos y tienen mucho interés para la cría de ganado (Neiff *et al.*, 2004).

Los bañados pueden definirse como: "*cuerpos de agua semipermanentes, situados en terrenos bajos de pendiente suave, con fondo arenoso o arenoso-arcilloso y horizonte orgánico superficial de pocos centímetros de espesor. En los bañados reconocidos hasta el presente, el agua tiene bajo contenido de electrolitos y el pH se encuentra próximo al punto neutro. En los estiajes suelen quedar sin agua, generándose cambios apreciables en la vegetación, pasando de una etapa dominada por las plantas acuáticas (Nymphoides indica, Pontederia rotundifolia, Ludwigia peploides, etc.), a una fase en la que gradualmente se incrementa la dominancia de las plantas anfibias (Polygonum spp., Eleocharis spp., Enhydra anagallis, etc.). A pesar de la existencia de una fase de suelo descubierto de agua, la misma suele ser de menor duración que la fase acuática y ello posibilita que existan en esta última algas filamentosas, diatomeas, desmidiáceas, estadios ninfales de insectos y otras entidades propias del ambiente acuático entre los que se destacan tecamebianos, oligoquetos y nematodes, copépodos y algunos bivalvos. Los "bañados" resultan de reconocido interés ganadero, dado que en ellos alcanzan notable desarrollo las pasturas*

hidrófilas, con especies de valor forrajero como Leersia hexandra, Oplismenopsis najada y Eleocharis spp."

Los ***malezales*** se encuentran topográficamente más elevados que los bañados. Ocupan terrenos con suelos pesados, mal drenados, generalmente llanos o con una morfología ligeramente cóncava y sin ondulaciones (Neiff, 2003a). Están formados por un micro relieve fracturado en forma de columnas (montículos, mesetas y/o tacurúes) con cabezas planas o semiesféricas cubiertas principalmente por paja colorada (*Andropogon lateralis*) y un gran número y variedad de ciperáceas; las columnas poseen una altura variable de entre 10 y 60 cm y están separadas entre si por depresiones, valles o zanjas de 10 a 20 cm producto de la erosión hídrica (Pizzio *et al.*, 1994). En los malezales se observa una alternancia más o menos regular de períodos de suelo inundado y descubierto. La duración de cada una de estas fases es variable y depende de la ubicación topográfica y de las precipitaciones. Durante el período de anegamiento el agua escurre por los múltiples canales definidos entre los montículos, que constituyen una red dendrítica, causada por el arrastre de erosivo de materiales de los horizontes superiores. La reducción progresiva del encharcamiento (por evapotranspiración y escurrimiento) da lugar al reemplazo de la comunidad vegetal generando una alternancia natural de tres formas biológicas: acuática-palustre-terrestre en el mismo sitio (Neiff, 2003a).

Los malezales pueden definirse como: "*un tipo especial de bañados, donde al anegamiento estacional del suelo por lluvias locales, se le suma el efecto de procesos erosivos locales, el fuego y la actividad de agentes biológicos (hormigas y vacas) que pueden originar cambios direccionales (tendencia sucesional) por transformación de los paisajes prístinos en sistemas de menor capacidad de soporte biótico*".

Los ambientes lóticos presentes en el Macrosistema del Iberá ocupan menos del 5% de la superficie y están representados por los efluentes y canales secundarios, por donde el sistema vierte sus aguas al Río Paraná, y por los afluentes que aportan agua al sistema. Los canales de flujo permanente adecuan su diseño y pueden cambiar su posición en función de la cantidad de agua producida por las lluvias.

Los esteros y los bañados ocupan la mayor extensión y paradójicamente, son los menos conocidos (Neiff, 2004). Los ambientes leníticos y lóticos recién descriptos, integran un macrosistema en el cual muchos elementos y procesos se encuentran interconectados. Estos ambientes intercambian organismos y nutrientes a través del contacto de sus aguas y modifican su extensión, retrayendo o expandiéndose, en función del régimen de precipitaciones (Neiff, 2003a). El patrón de paisaje, el origen, la composición química de sus

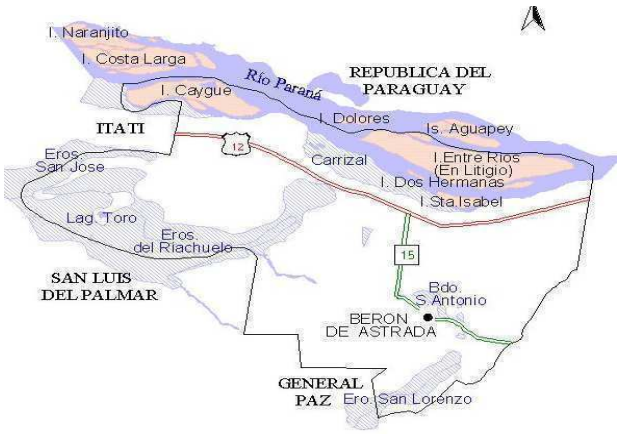
aguas, la elevada riqueza de especies vegetales y animales, su estado prístino y su posición biogeográfica hacen del Iberá un sistema único en América (Neiff y Poi de Neiff, 2006).

2.2.3. Berón de Astrada

El Departamento de Berón de Astrada se encuentra al norte de la Provincia de Corrientes (Fig. 2.7) y está delimitado al este por el estero Santa Lucía, al oeste por el estero Riachuelo y al norte por el río Paraná (Fig. 2.8). El Departamento posee una extensión de 804 Km², que representan el 1% de la superficie Provincial. Es un territorio de llanura en el cual se encuentran lagunas, esteros, bañados, malezales y arroyos, estos últimos de escasa profundidad y con un amplio valle de inundación. Las características climáticas, hidrográficas y topográficas benefician el desarrollo de la ganadería y la agricultura, con un marcado predominio por la producción de arroz.

Figura 2.7: Ubicación del Departamento de Berón de Astrada en la Provincia de Corrientes.

Figura 2.8: Mapa hidrográfico del Departamento de Berón de Astrada.



Este Departamento forma parte de la región denominada NW-Iberá/Neembucú ubicada en el sector occidental de la Región del Iberá (Neiff y Poi de Neiff, 2006) (Fig. 2.5). Esta región pertenece al territorio fitogeográfico del Dominio Chaqueño, Distrito Oriental Chaqueño, SubDistrito Correntino, Sector del parque chaqueño-Correntino, según la clasificación de Cabrera y Willink (1973), que equivale, según Carnevali (1994), a la subregión del albardón y planicie subcóncava del Noroeste (1.I.A) de la región natural denominada “Gran región occidental” (Fig. 2.4 y 2.9). Esta subregión ocupa una superficie aproximada de 1.024.000 ha donde se destacan planicies embutidas en lomadas arenosas, constituyendo una planicie de relieve subcóncavo a plano. El relieve es más elevado en el

extremo NE (65 m) lo cual genera una suave pendiente y escurrimiento en sentido NE-SO, que permite la eliminación de los excedentes de agua a través de una red fluvial dispuesta en abanico (Carnevali, 1994). A pesar de su aparente chatura se distinguen 6 unidades de paisaje bien definidas. En el extremo E de esta subregión, donde está ubicada el área de muestreo (Fig. 2.10), predominan por un lado las depresiones sin cauce con escurrimiento direccional (esteros y bañados) y el predominio de vegetación palustre y acuática (U.P. Nº6), y por el otro, planicies subcóncavas, con escasa pendiente e hidromorfismo acentuado, con graves problemas de drenaje y anegamiento, cuyo excedente de agua de lluvia es volcado en los esteros limítrofes y donde predominan la sabana abierta con malezales y pajonales (U.P Nº5) (Fig. 2.10) (Carnevali, 1994).

Figura 2.9: Ubicación relativa de la Subregion 1.I.A en la Provincia de Corrientes.

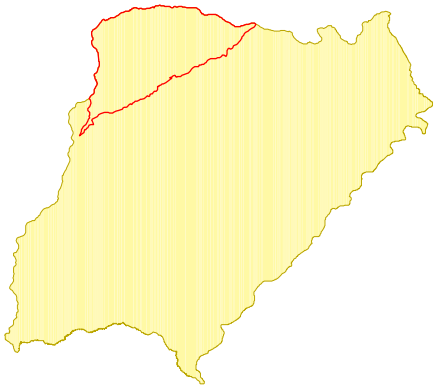
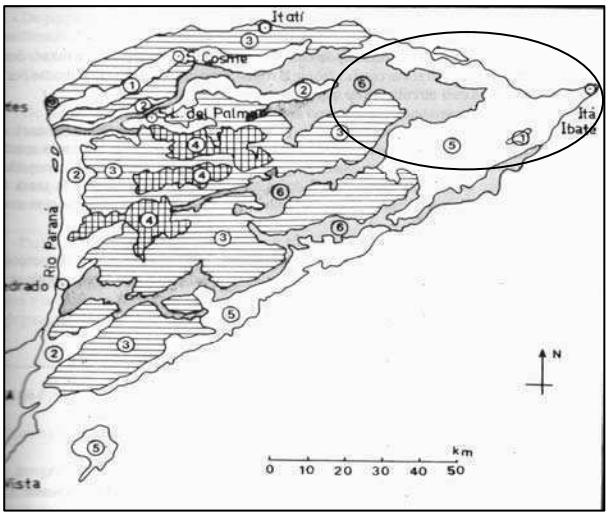


Figura 2.10: Subregion 1.I.A: Unidades de paisaje: 1: lomadas y planicies arenosas del Noroeste; 2: Dique natural del Paraná medio y afluentes; 3: Quebrachales y sabanas graminosas; 4: Quebrachales; 5: sabanas y sabanas-parque de Schinopsis y Prosopis spp., 6: esteros y bañados del Noroeste. Circulo indica la zona de estudio.



Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe la metodología general aplicada a lo largo de todo el estudio.

3.1 Selección del lugar de estudio

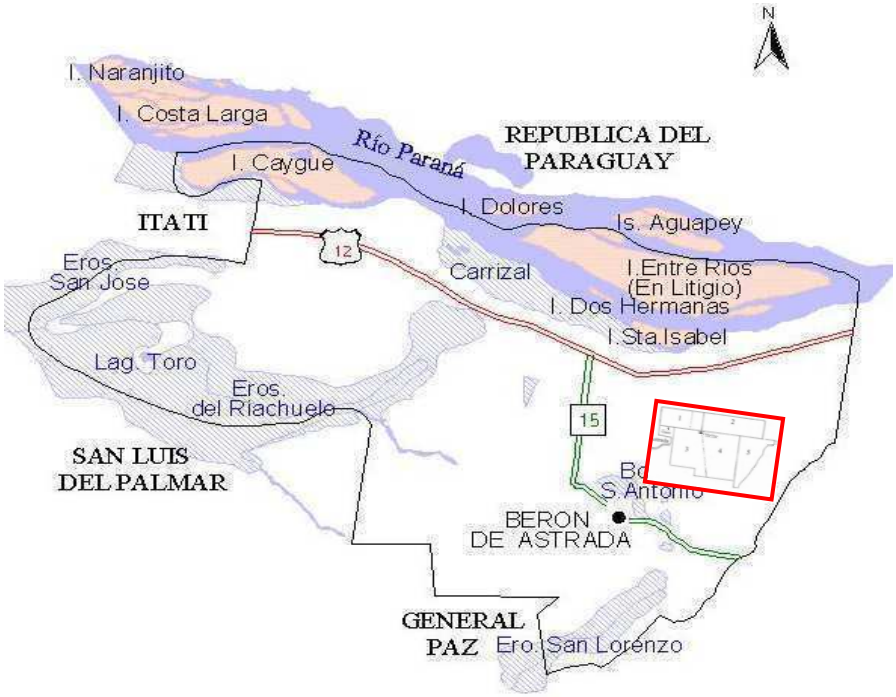
Para seleccionar un establecimiento ganadero en el Departamento de Berón de Astrada, se consultó a los Drs. en Medicina Veterinaria Ricardo Moriena, Oscar Racioppi y José Álvarez, expertos en el estudio de la distribución y la prevalencia de la fasciolosis en la Provincia de Corrientes. El grupo liderado por el Dr. Moriena estudia desde 1975 los niveles de infección por *F. hepatica* en distintos hospedadores definitivos, tanto domésticos (bovinos y búfalos) como silvestres (carpinchos) y tiene a su cargo la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

El establecimiento a seleccionar debía reunir las siguientes condiciones: 1) poseer ganado bovino infectado con *F. hepatica* y 2) que ese ganado fuera nacido y criado en el establecimiento, para garantizar que el foco de transmisión fuese local.

En base a la información suministrada, se seleccionó el establecimiento ganadero “Don Ricardo” (27º33`S, 57º32`O) ubicado al este del Departamento de Berón de Astrada, a 3 km del área urbanizada (Fig. 3.1).

Período de estudio: El estudio se desarrolló entre **noviembre de 2002 y noviembre de 2005**. Durante este período se registraron en forma continua la temperatura del aire y la precipitación y se realizaron muestreos estacionales para conocer los niveles de infección por *F. hepatica* en el hospedador definitivo e intermediario y para estudiar la abundancia y la dinámica poblacional de éste último.

Figura 3.1: Mapa del Departamento de Berón de Astrada. El rectángulo rojo indica la ubicación del establecimiento seleccionado.



3.2 Variables climáticas

La **temperatura del aire** se registró con un sensor HOBO Data Logger ubicado estratégicamente en el establecimiento, al reparo del sol y fuera del alcance de los animales. Por fallas en el funcionamiento del mismo, como la falta de registro o el agotamiento anticipado de la pila, no fue posible obtener un registro continuo de esta variable. Para solucionar este inconveniente, se obtuvieron registros diarios de temperatura mínima, máxima y media del aire de la estación meteorológica más cercana al área de estudio, ubicada en el aeropuerto de la ciudad de Corrientes (27º45`S, 58º76`O) distante 145 Km de la localidad de Berón de Astrada. Se calculó la relacion entre los valores registrados por el sensor y los obtenidos de la estación meteorológica mediante una regresión lineal (Sokal y Rohlf, 1969) para aquellos períodos en los cuales se contaba con ambas fuentes de datos. Esa funcion de ajuste permitió calcular la temperatura del aire en los meses en los cuales no hubo registro del sensor. Esta prueba se realizó habiéndose comprobado previamente mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (K-S) (Daniel, 1990) que las dos bases de datos poseían la misma distribución ($p > 0,05$).

En la Tabla 3.1 se muestran las ecuaciones resultantes de la regresión lineal entre la temperatura del aire registrada por el sensor y la obtenida de la estación meteorológica del aeropuerto de Corrientes. Con estas ecuaciones se calcularon la temperatura mínima, media y máxima mensual del aire en el establecimiento a partir de los valores de la estación meteorológica seleccionada (Tabla 3.2).

Tabla 3.1.: Ecuaciones lineales obtenidas por regresión lineal entre la temperatura del aire registrada por el sensor ubicado en el establecimiento "Don Ricardo" y la temperatura del aire registrada en la estación meteorológica del aeropuerto de Corrientes.

	Regresión lineal		
Mes	Temperatura mínima	Temperatura media	Temperatura máxima
Enero	**y**=1,01**x**-0,75	**y**=0,97**x**+0,36	**Y**=1,0**x**-1,24
Febrero	**y**= 0,90**x**+0,77	**y**=1,02**x**-0,73	**y**=1,01**x**-1,24
Marzo	**y**=0,63**x**+6,15	**y**=0,85**x**+3,48	**y**=0,88**x**+4,03
Abril	**y**=0,88**x**+2,51	**y**=0,97**x**+0,52	**y**=0,96**x**+0,51
Mayo	**y**=0,80**x**+3,74	**y**=0,80**x**+3,80	**y**=0,78**x**+4,80
Junio	**y**=0,80**x**+3,73	**y**=0,85**x**+2,82	**y**=0,94**x**+0,35
Julio	**y**=0,80**x**+1,82	**y**=0,90**x**+1,34	**y**=0,93**x**+0,77
Agosto	**y**=0,88**x**+1,32	**y**=0,94**x**+0,78	**y**=0,98**x**-0,01
Septiembre	**y**=0,90**x**+1,84	**y**=0,94**x**+1,13	**y**=0,75**x**+6,14
Octubre	**y**=0,65**x**+4,94	**y**=0,71**x**+6,08	**y**=0,70**x**+7,91
Noviembre	**y**=0,90**x**+1,84	**y**=0,94**x**+1,13	**y**=0,75**x**+6,14
Diciembre	**y**=0,69**x**+6,73	**y**=0,81**x**+4,52	**y**=0,60**x**+12,39

y= valor estimado de la temperatura del aire en el establecimiento
x= valor de la temperatura registrada en la estación meteorológica del aeropuerto de Corrientes.

Los valores de la **precipitación** mensual fueron obtenidos directamente de la estación meteorológica ubicada en el aeropuerto de la ciudad de Corrientes (27º45`S, 58º76`O) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.: A) Temperatura mínima, media y máxima mensual del aire calculada a partir de las ecuaciones obtenidas por regresión lineal entre datos del sensor y de la estación meteorológica del aeropuerto de Corrientes. **B)** Valores mensuales de precipitación obtenidas de la estación meteorológica del aeropuerto de Corrientes.

Período de muestreo			**A** (℃)			**B** (mm)
	Año	Mes	Temperatura mínima *	Temperatura media *	Temperatura máxima *	Precipitación **
	2002	Enero	13,6	25,6	35,2	225,0
		Febrero	15,8	25,2	34,2	42,4
		Marzo	16,3	26,2	36,2	245,9
		Abril	12,6	21,3	32,5	305,1
		Mayo	11,0	20,0	29,6	84,1
		Junio	6,5	15,8	28,7	26,7
		Julio	5,8	14,3	28,2	125,7
		Agosto	5,0	18,1	31,9	89,7
		Septiembre	5,1	18,4	32,5	87,6
		Octubre	10,1	22,3	33,1	193,0
		Noviembre	12,8	23,6	33,6	224,3
		Diciembre	18,0	26,7	35,0	170,2
	2003	Enero	13,7	25,8	36,6	103,6
		Febrero	13,5	26,1	38,1	193,5
		Marzo	14,0	23,9	34,0	156,2
		Abril	8,6	21,4	32,8	121,2
		Mayo	7,2	18,6	29,6	111,3
		Junio	7,5	19,5	30,0	4,0
		Julio	2,6	15,5	31,4	6,1
		Agosto	3,5	15,2	33,4	55,1
		Septiembre	4,5	19,8	35,5	137,9
		Octubre	10,3	22,3	35,2	224,0
		Noviembre	10,2	23,3	36,0	190,0
		Diciembre	16,2	25,4	33,3	350,8
	2004	Enero	15,5	27,0	34,9	0,5
		Febrero	13,3	25,3	40,0	104,6
		Marzo	13,5	25,0	38,4	54,4
		Abril	9,9	23,4	37,7	118,4
		Mayo	6,8	15,8	25,0	3,8
		Junio	5,4	17,3	28,9	141,5
		Julio	2,6	15,7	29,1	42,7
		Agosto	2,0	16,0	31,4	40,6
		Septiembre	6,6	19,7	33,8	141,0
		Octubre	12,0	21,1	31,2	158,2
		Noviembre	11,7	22,6	31,6	239,5
		Diciembre	18,5	25,1	34,0	133,3
	2005	Enero	13,9	26,9	35,5	81,3
		Febrero	15,2	25,9	38,1	53,6
		Marzo	14,8	24,7	37,5	131,3
		Abril	10,6	20,7	33,3	358,6
		Mayo	8,0	19,4	28,8	89,4
		Junio	7,5	19,0	28,7	47,8
		Julio	2,6	15,5	30,7	3,0
		Agosto	5,2	17,4	31,6	49,0
		Septiembre	4,3	16,8	31,6	34,8
		Octubre	12,0	20,2	35,2	80,8
		Noviembre	12,3	23,8	33,0	383,0
		Diciembre	16,4	18,7	34,7	61,0

*calculada a partir de las ecuaciones lineales obtenidas por regresión lineal
**obtenidos de la estación meteorológica del aeropuerto de Corrientes

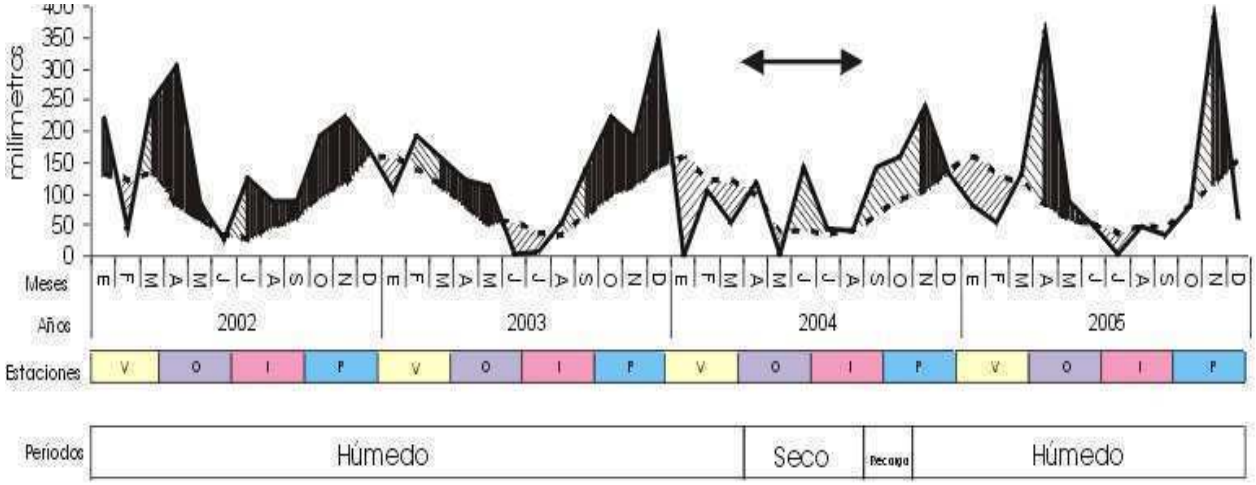
Para conocer las condiciones de humedad en los distintos ambientes del establecimiento seleccionado, se confeccionó un balance hídrico de acuerdo al método de Thornthwaite y Mather (1957) para el período de estudio. El balance hídrico se calculó con los valores de la temperatura media mensual del aire y la precipitación mensual (Tabla 3.2). Este análisis permite establecer el régimen hídrico del suelo mediante el cálculo de los cambios que se producen en la entrada, la salida y el almacenamiento del agua en la superficie del suelo. Así, es posible identificar períodos de exceso, de déficit, de almacenamiento o de utilización del agua del suelo, los cuales determinan períodos favorables o desfavorables para el desarrollo de los caracoles y para la transmisión del ciclo de vida de *F. hepatica* (Malone *et al.*, 1984).

En la Figura 3.2 se muestran los resultados del Balance hídrico. Entre abril (otoño) y agosto (invierno) de 2004 se observa la ausencia de un exceso de agua, en contraste con el mismo período en los años 2002, 2003 y 2005, donde se registraron 4, 2 y 2 meses con exceso de agua, respectivamente (Fig. 3.2). Esto indica que, a pesar de no haberse registrado déficit de agua, este período en 2004 fue significativamente más seco que los demás, situación que pudo corroborarse en el establecimiento, al observar que todos los ambientes acuáticos se secaron completamente. Entre septiembre y octubre de 2004 se observó un período de recarga del agua del suelo como consecuencia de un aumento sostenido de las precipitaciones y de la acumulación del agua de lluvia en los distintos ambientes (Fig. 3.2) y en noviembre de 2004 se detectó un período de exceso de agua, similar a lo observado en los años anteriores y posterior (Fig. 3.2).

Las particularidades observadas en otoño, invierno y principios de primavera de 2004 permitieron dividir el estudio en 4 períodos consecutivos (Fig. 3.2) cuya duración y denominación se indican a continuación:

- **Primer período húmedo** (entre enero de 2002 y marzo de 2004).
- **Período seco** (entre abril y agosto de 2004).
- **Período de recarga** (entre septiembre y octubre de 2004).
- **Segundo período húmedo** (entre noviembre de 2004 y diciembre de 2005).

Figura 3.2: Balance hídrico para el período 2002-2005 en Berón de Astrada, Corrientes.
Precipitación: línea continua; Evapotranspiración potencial (ETP): línea punteada; Exceso de agua: líneas verticales; Reposición del agua: líneas oblicuas hacia abajo ( ); Utilización del agua: líneas oblicuas hacia arriba ( ). La flecha con dos cabezas indica la duración del período de sequía.



Dentro de los períodos húmedos se observó la siguiente tendencia estacional: veranos con predominio de períodos de utilización del agua del suelo como consecuencia de que la precipitación es menor que la evapotranspiración, esta última elevada por las altas temperaturas; otoños y primaveras con alternancia de períodos de reposición y de exceso del agua en el suelo como consecuencia de aumento en las precipitaciones y disminución de la evapotranspiración; inviernos sin un patrón definido (Fig. 3.2).

A nivel general, los períodos húmedos estuvieron caracterizados por exceso de agua, el período seco por escasas precipitaciones y sequía, y el período de recarga por un aumento en las precipitaciones (Fig. 3.2).

La abundancia, la estructura y la dinámica poblacional del hospedador intermediario y la prevalencia de infección por *F. hepatica* en ambos hospedadores (intermediario y definitivo) fueron analizados en función de los períodos mencionados anteriormente. Estos análisis permitieron comparar los resultados obtenidos **antes, durante y después de la sequía** y evaluar el efecto de esta situación ambiental desfavorable sobre la dinámica de transmisión de *F. hepatica*.

3.3 Hospedador definitivo

El establecimiento “Don Ricardo” posee 2.200 ha dedicadas exclusivamente a la cría de ganado bovino, aunque también se cría ganado ovino en menor escala y solo para consumo interno. La carga ganadera es de aproximadamente 70 ovinos y 1.100 bovinos de la raza Braford (Fig. 3.3). Esta raza sintética combina la rusticidad y la adaptabilidad del Cebú (raza Brahman), con la calidad y la eficiencia en la producción de carne y leche, la mansedumbre y la fertilidad de la raza bovina Hereford. La raza Braford posee mayor resistencia a enfermedades, menor selectividad alimenticia, una reconocida fertilidad y fecundidad, una alta longevidad, un temperamento dócil y una gran plasticidad (http://www.braford.org.ar). Es una raza adaptada a condiciones subtropicales y tropicales.

Figura 3.3: Ganado bovino de la raza Braford

En Argentina la raza Braford se encuentra ampliamente distribuida en el norte y en los esteros de la Provincia de Corrientes, donde predominan condiciones ambientales difíciles para la ganadería (altas temperaturas, sequías, inundaciones, etc.), razón por la cual no prospera la cría de otras razas bovinas (http://www.braford.org.ar).

Al igual que en el resto de la Provincia de Corrientes, los bovinos machos nacidos en el establecimiento son vendidos al ser destetados. Las hembras se dividen entre las que son mantenidas como vientres para continuar con la cría, las que permanecen aproximadamente 1.5 años y luego son trasladadas temporalmente a otro campo ganadero en la Localidad de Ita Ibaté (12 km al norte de la ciudad de Berón de Astrada) y las que son vendidas para engorde a establecimientos ganaderos ubicados en la Pampa Húmeda, debido a la mejor calidad de sus pastos.

La vegetación dominante en el establecimiento son pastizales y malezales de *Andropogon lateralis* y pajonales de *Paspalum sp.*, de baja calidad para el ganado (Pizzio *et al.*, 1994). El establecimiento, ubicado en una zona de lomadas y depresiones, posee y se

encuentra rodeado por ambientes acuáticos temporales como bañados, esteros y malezales que son alimentados principalmente por agua de lluvia y en menor medida por vertientes que darán origen al arroyo y estero San Lorenzo (Fig. 3.1).

Las 2.200 ha del establecimiento “Don Ricardo” están divididas en 5 potreros de 200-500 ha cada uno. El manejo general del ganado bovino se basa en una baja rotación entre potreros y una gran rotación dentro de cada potrero. Los potreros son similares en cuanto al relieve, la vegetación y el tipo de ambientes acuáticos.

El establecimiento no posee un programa específico de tratamiento antiparasitario. Las drogas más usadas son Ivermectina y Albendazol que se aplican indistintamente cada tres meses (otoño, invierno y primavera-verano), entre el destete y el año y medio del animal. Las hembras de más de 2 años son tratadas una o dos veces al año. La Ivermectina es un antiparasitario de amplio espectro usado en el tratamiento y control de parasitosis internas y externas del ganado bovino y ovino, que no tiene efectos sobre *F. hepatica* (Fairweather y Boray, 1999). El Albendazol es un carbamato benzoimidazólico con efectos antihelmínticos y antiprotozoarios frente a los parásitos tisulares e intestinales. Esta droga es eficaz contra el estadio adulto de *F. hepatica* y su eficacia aumenta al aumentar la edad del parásito, observándose una eficacia del 50-70% frente a fasciolas de 10 y 11 semanas y del 80-99% frente a fasciolas mayores a 12 semanas (Fairweather y Boray, 1999).

3.3.1 Actividades realizadas en el establecimiento

3.3.1.1 Muestreos

Con el propósito de estudiar la prevalencia de infección por *F. hepatica* en el ganado bovino del establecimiento “Don Ricardo” primero se dividió a los animales en las siguientes categorías etarias de interés epidemiológico: **terneros** (hembras y machos hasta 6 meses sin destetar), **vaquillonas** (hembras desde el destete hasta la primera parición; 22-27 meses) y **vacas** (hembras de 3 a 9 años).

Para conocer la prevalencia de infección por *F. hepatica* y el aporte de huevos al medio entre categorías etarias dentro de cada estación y entre estaciones, durante el primer período húmedo (antes de la sequía) se recolectaron muestras de materia fecal de terneros, vaquillonas y vacas en primavera de 2002, verano, otoño y primavera de 2003 (Fig. 3.4).

Durante y después de la sequía se seleccionaron dos grupos de bovinos a los cuales se les hizo un seguimiento de la prevalencia por *F. hepatica* y del aporte de huevos al medio desde su destete y hasta los 12 meses. Cada uno de estos grupos representa a una cohorte. Las muestras de materia fecal de la primera cohorte fueron recolectadas en el período seco (otoño e invierno de 2004), en el período de recarga (principios de primavera de 2004) y en el segundo período húmedo (primavera de 2004 y de 2005) (Fig. 3.4). Las muestras de materia fecal correspondientes a la segunda cohorte fueron recolectadas exclusivamente durante el segundo período húmedo en verano, invierno y a principios de primavera de 2005 (Fig. 3.4).

En total se realizaron 11 muestreos de materia fecal de ganado bovino cuya distribución en los períodos en los que se dividió el estudio se muestra en la figura 3.4

En cada muestreo, se seleccionó al azar un número representativo de animales de cada categoría etaria, todos ellos debidamente identificados con caravanas numeradas. Los animales fueron agrupados en corrales y se los hizo pasar a través de una manga de trabajo para facilitar el manejo individual. La extracción de materia fecal se realizó directamente del recto de cada animal, mediante la utilización de un guante veterinario. Cada muestra se identificó individualmente y conservó en un freezer (-19ºC) hasta su procesamiento en el laboratorio.

Figura 3.4: Muestreos de materia fecal de ganado bovino en el establecimiento "Don Ricardo" en Berón de Astrada, Corrientes. Ref.; asteriscos negros: muestreos realizados en todas las categorías etarias; asteriscos rojos: muestreos correspondientes a la primera cohorte; asteriscos celestes: muestreos correspondientes a la segunda cohorte.

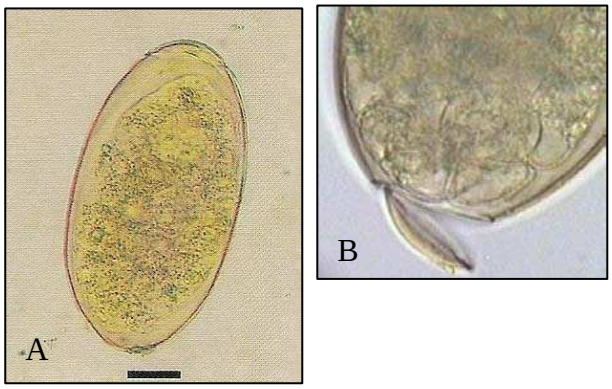
3.3.2 Actividades realizadas en el laboratorio

3.3.2.1 Método de diagnóstico

Para el diagnóstico de infección por *F. hepatica* se utilizó la técnica de sedimentación de Dennis, Stone y Swanson (1954) para la detección de huevos en la materia fecal. Esta técnica se basa en que la velocidad de caída o de sedimentación de los huevos de *F. hepatica* es mayor que la de los detritos presentes en la materia fecal (ver procedimiento en ANEXO 1).

La identificación de los huevos de *F. hepatica*, se realizó a partir de sus características morfológicas (Fig. 3.5). Estos son de forma ovalada u ovoide, con una envoltura lisa de color amarillento o marrón claro. En una de sus extremidades posee un pequeño opérculo (Fig. 3.5 B) y sus medidas varían entre 130 - 140 µm de largo por 70 - 90 µm de ancho (Bacigalupo, 1934).

Figura 3.5: Huevo de *Fasciola hepatica*. **A.** Vista general. **B.** Detalle del opérculo abierto. Escala: 25 µm



Se contabilizó el número total de huevos en cada muestra (8 g) y se calculó el número de huevos por gramo de materia fecal (hpg) como estimador de la contaminación de las pasturas. La prevalencia de infección se calculó como el número de animales infectados sobre el total de animales analizados.

La recolección, traslado, conservación y procesamiento de las muestras de materia fecal estuvo a cargo de los Drs. en medicina Veterinaria Ricardo Moriena, Oscar Racioppi y José

Álvarez, del laboratorio de Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

3.3.3. Análisis estadístico

3.3.3.1. Infección por *F. hepatica* en el primer período húmedo

En el primer período húmedo se comparó la prevalencia de infección por *F. hepatica* entre terneros, vaquillonas y vacas por estación y entre estaciones mediante la prueba de χ^2 para **muestras independientes**. Cuando el número de muestras a comparar fue igual a dos se utilizó la prueba de χ^2 para dos proporciones independientes (Fleiss, 1981). Cuando se compararon más de dos proporciones se utilizó la prueba de χ^2 para proporciones múltiples (Fleiss, 1981) y a posteriori, cuando fue necesario, el procedimiento de Tukey para múltiples comparaciones de a pares (Zar, 1999). Estos análisis se realizaron con el programa WINPEPI (Abramson, 2004).

Durante este período también se comparó el número de huevos por gramo de materia fecal (hpg) entre terneros, vaquillonas y vacas por estación y entre estaciones mediante las siguientes pruebas no paramétricas para muestras independientes: cuando sólo se compararon dos muestras se utilizó la prueba Mann-Whitney (Daniel, 1990) y cuando el número de muestras a comparar fue mayor a dos se utilizó la prueba de Kruskall-Wallis, y a posteriori, cuando fue necesario, el test de Dunn (Daniel, 1990). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).

3.3.3.2 Infección por *F. hepatica* en 2 cohortes en el período seco, de recarga y segundo período húmedo

Durante y después de la sequía se comparó la prevalencia de infección por *F. hepatica* de los individuos de cada cohorte por separado a lo largo del tiempo mediante las siguientes pruebas no paramétricas para **muestras dependientes**: cuando sólo se compararon dos proporciones se utilizó la prueba χ^2 de McNemar (Sokal y Rohlf, 1969) y cuando el número de proporciones a comparar fue mayor a dos se utilizó la prueba Q de Cochran (Fleiss, 1981; Sokal y Rohlf, 1969). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).

Durante estos períodos también se comparó el número de huevos por gramo de materia fecal (hpg) de los individuos de cada cohorte por separado a lo largo del tiempo mediante las siguientes pruebas no paramétricas para muestras dependientes: cuando sólo se compararon dos muestras se utilizó la prueba de Wilcoxon (Daniel, 1990) y cuando el número de muestras a comparar fue mayor a dos se utilizó la prueba de Friedman (Daniel, 1990). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).

3.3.3.3. Infección por *F. hepatica* por categoría etaria entre períodos

Para comparar la prevalencia de infección por *F. hepatica* de cada categoría etaria entre períodos se utilizó la prueba de χ^2 para **muestras independientes** (Ver sección 3.3.3.1 para la especificación del tipo de prueba a utilizar en relación al número de muestras a comparar).

Los resultados de esta sección se presentan en el **Capítulo 6, sección 6.5.1. (Página 113)**

3.4 Hospedador intermediario

3.4.1. Actividades realizadas en el establecimiento

3.4.1.1. Muestreos

Los muestreos de caracoles se realizaron entre noviembre de 2002 y noviembre de 2005 en forma estacional en verano (marzo), otoño (mayo), invierno (septiembre) y primavera (noviembre). En total se realizaron 14 muestreos que se distribuyeron de la siguiente manera en los distintos períodos en los que se dividió el estudio (Fig. 3.2):

- **Primer período húmedo** → incluye los muestreos de primavera 2002, verano, otoño, invierno y primavera 2003 y verano 2004,
- **Período seco** → incluye el muestreo de otoño 2004,
- **Período de recarga** → incluye el muestreo de invierno 2004 y uno adicional a principios de primavera 2004,
- **Segundo período húmedo** → incluye los muestreos de primavera 2004 y verano, otoño, invierno y primavera 2005.

Durante el período de recarga se agregó un muestreo adicional a principios de primavera, en octubre de 2004, para estudiar el efecto de la sequía en la población de caracoles y en su recuperación.

3.4.1.1.1. Ambientes

Los muestreos se llevaron a cabo en dos humedales típicos de la región Noreste de la Provincia de Corrientes: un bañado y un malezal (ver definiciones y características generales en el capítulo 2, sección 2.2.2 y 2.2.3). En el establecimiento elegido para el estudio, estos dos ambientes estaban contiguos y presentaban las siguientes particularidades:

1) El **Bañado,** de 938,1 m de perímetro y forma aproximadamente circular (Fig. 3.6 A), contenía abundante vegetación acuática, entre las cuales se destacaban las flotantes *Salvinia* spp y *Pistia* spp y las enraizadas *Pontederia lanceolata* y *Eleocharis* spp (Fig. 3.6 B,C); la profundidad en el centro del bañado superaba los 1.5 m y en el borde alcanzaba los 70 cm (Fig. 3.6 B,C) y

2) El **Malezal** ocupa una superficie aproximada de 24.300 m^2 (Fig. 3.6 A); la base de los montículos está dominada por gramíneas del género *Andropogon* (Fig. 3.6 C), las cuales constituyen una parte importante en la dieta del ganado bovino.

La erosión hídrica generó la formación de canales alrededor de los montículos por donde drena el agua de lluvia hacia el bañado que se encuentra topográficamente más deprimido que el malezal (Neiff, 2003a). Esta disposición espacial de los elementos que conforman este ambiente le confiere su fisonomía característica. Los canales alrededor de los montículos presentan anchos variables (Fig. 3.6 A) con características estructurales distintas, que podrían representar 2 hábitats potencialmente diferentes para los caracoles. Por esta razón, se delimitaron dentro del Malezal los canales angostos y los canales anchos. Los canales angostos son surcos alrededor de los montículos de entre 5 y 20 cm de ancho y hasta 25 cm de profundidad, que conforman una red muy ramificada (Fig. 3.6 C). Los pastos que crecen sobre la base de los montículos obstruyen la llegada de los rayos del sol, dejando a estos ambientes permanentemente ensombrecidos (Fig. 3.6 C). Los canales anchos son surcos que miden entre 20 y 50 cm de ancho y hasta 40 cm de profundidad delimitados a ambos lados por montículos (Fig. 3.6 B). Su longitud es muy variable, alcanzando una extensión máxima de 270 m; su trayectoria es sinuosa y su leve pendiente en dirección al Bañado provoca que las porciones cercanas a éste retengan agua por más tiempo y sean las últimas en secarse; cuando estos canales están anegados se observa una leve corriente en dirección al bañado.

Estos ambientes se llenan exclusivamente con agua de lluvia y quedan interconectados luego de períodos de fuertes precipitaciones, principalmente en primavera.

3.4.1.1.2. Sitios de muestreo

De la extensión total del **Bañado**, se seleccionó la porción contigua al Malezal cuya extensión (480 m) representa aproximadamente el 50% del perímetro total (Fig. 3.6 A). En esta porción se estableció un borde, que se define como el espacio entre la orilla y los primeros 60 cm hacia adentro medidos en forma perpendicular. La profundidad registrada en el borde osciló entre 0 y 70 cm. Hacia el centro del bañado la profundidad aumenta significativamente imposibilitando la realización de los muestreos. A lo largo del borde se establecieron 8 sitios de muestreos equidistantes 60 m entre sí (Fig. 3.6 A) que se mantuvieron fijos a lo largo de todos los muestreos. Los sitios eran homogéneos en relación a su fisonomía y apariencia.

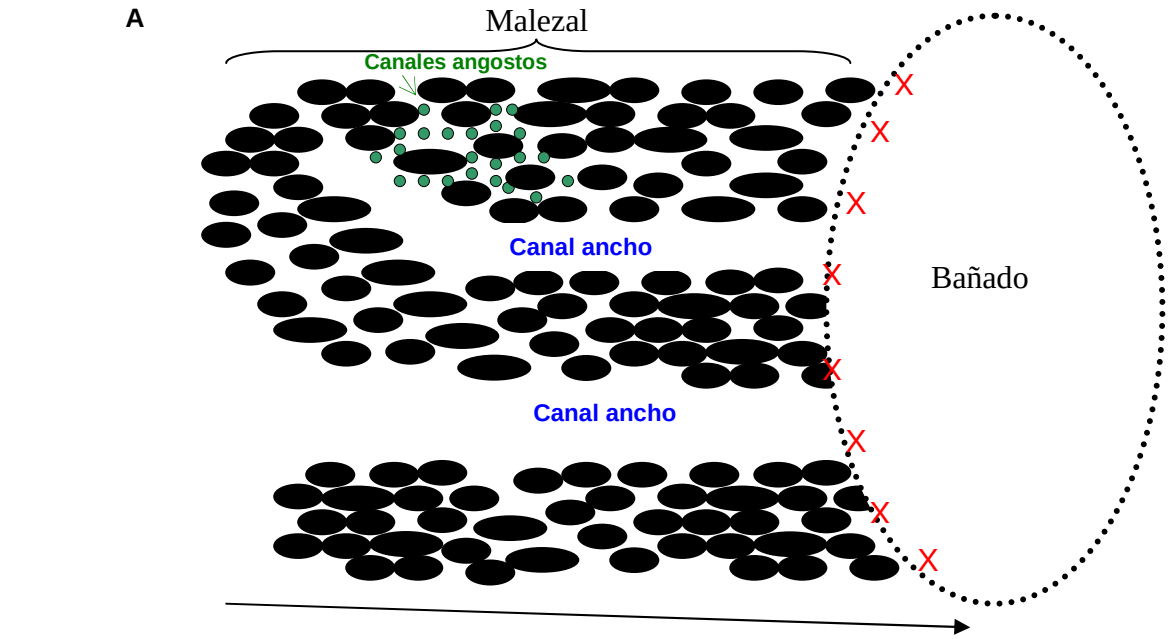
En el **Malezal** se delimitó un área de 50 m x 90 m y en ella se seleccionaron al azar 4 canales anchos, en cada uno de los cuales, según su extensión, se establecieron entre 1 y 4 sitios de muestreo equidistantes 75 m entre sí que se mantuvieron fijos a lo largo de todos los muestreos. En esta misma área se seleccionaron 8 montículos al azar que se mantuvieron fijos a lo largo de todos los muestreo y se establecieron como sitios de muestreo todos los canales angostos circundantes (Fig. 3.6 A).

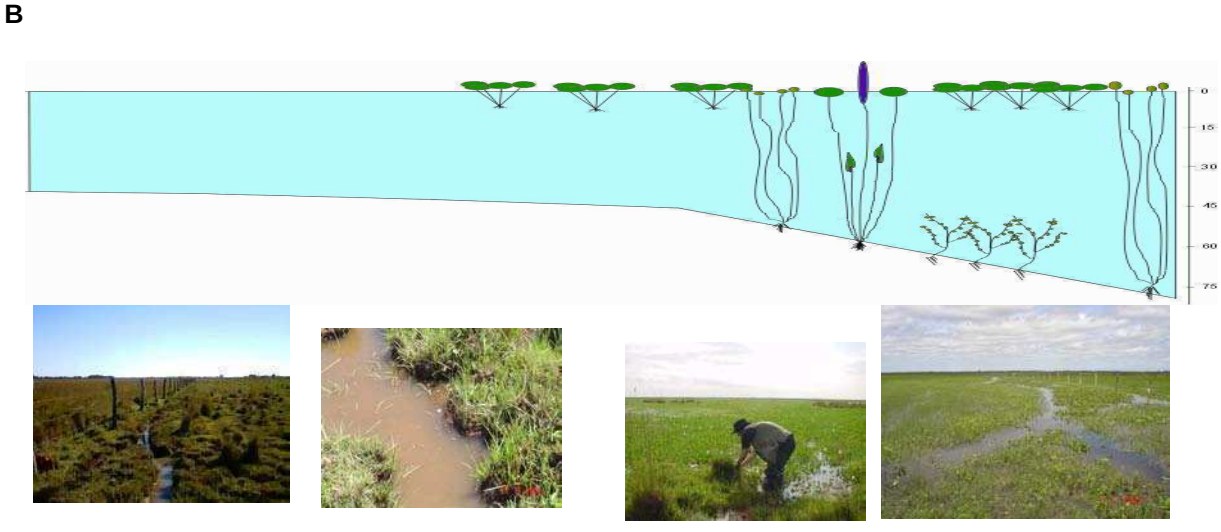
3.4.1.1.3. Recolección de caracoles

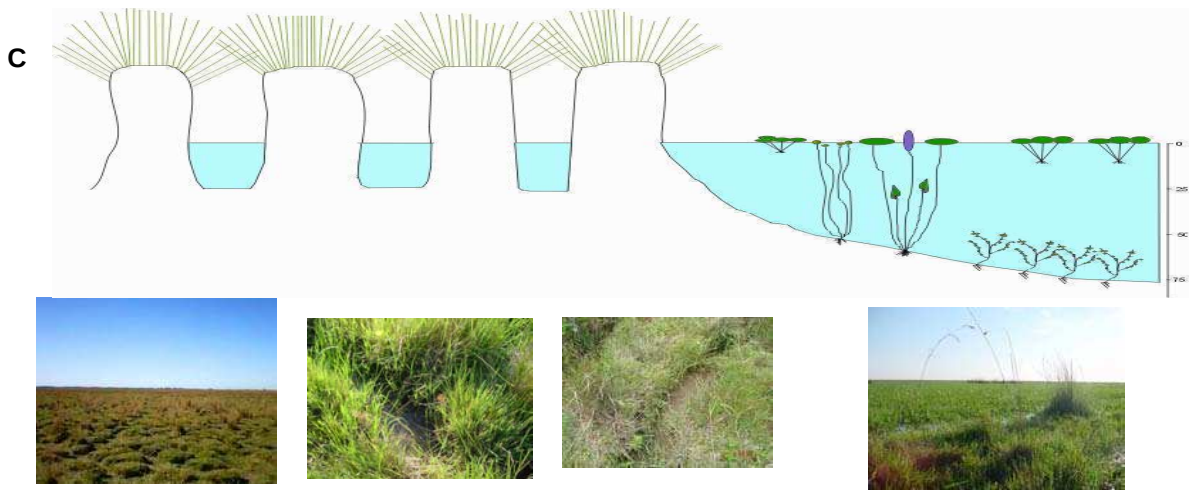
En los 14 muestreos y en cada sitio de muestreo se recolectaron todas las especies de caracoles presentes utilizando el método de captura por remoción (Rabinovich, 1980). Éstos fueron recolectados en toda la columna de agua desde el fondo hasta la superficie y en el centro y los bordes. Los caracoles fueron recolectados durante 30 minutos por una sola persona, quien utilizó la mano o un colador de malla metálica fina (1 mm de poro). Para estudiar la estructura poblacional de la familia Lymnaeidae la búsqueda se extendió a 2 horas.

Cuando los ambientes se secaron, se buscaron caracoles sobre la superficie y en el fondo, cavando agujeros de 20 cm de diámetro por 20 cm de profundidad. La tierra seca extraída fue revisada minuciosamente *in situ*, en busca de caracoles vivos y/o conchillas vacías. También se buscaron caracoles en restos de vegetación seca como troncos, hojas, tallos, etc.

Figura 3.6: **A.** Esquema de la disposición espacial del Malezal y el Bañado en el establecimiento "Don Ricardo"; **B.** Perfil a nivel de los canales anchos del Malezal; **C.** Perfil a nivel de los canales angostos del Malezal. Ref: Círculos negros: montículos; círculos verdes: canales angostos; flecha: sentido de la pendiente; cruces: sitios de muestreos en el borde del Bañado.







En el campo se realizó una primera clasificación de los caracoles recolectados, dividiéndolos a nivel de familia en base a su apariencia externa. Los ejemplares de cada familia fueron colocados aisladamente en recipientes de plástico conteniendo agua del sitio de colecta y rotulados con la fecha, el sitio de muestreo y la clasificación taxonómica. Los caracoles fueron trasladados vivos al laboratorio de la Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parásitos en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN-UBA).

3.4.1.1.4. Variables ambientales

En cada sitio de muestreo, simultáneamente con la colecta de caracoles se registraron los valores de pH, temperatura y columna de agua y se estimó cualitativamente el tipo de vegetación y su cobertura.

La **temperatura del agua** se registró con un termómetro digital con un rango de medición entre -10ºC a +100ºC y 0,1ºC de precisión; el **pH** se registró con un pHmetro digital con un rango de medición entre 0 y 14 y una precisión de 0,1 pH; la **columna de agua** se registró con una cinta métrica de 100 m de longitud; la vegetación fue clasificada en acuática, palustre o terrestre.

Los resultados correspondientes a esta sección se presentan en el **Capítulo 5, sección 5.5.1: Ambientes** (Página 77).

3.4.2. Actividades realizadas en el laboratorio

3.4.2.1 Caracoles de la familia Lymnaeidae

3.4.2.1.1 Identificación taxonómica

La identificación de los individuos de la familia Lymnaeidae se realizó a partir de las características morfológicas y/o morfométricas de la conchilla, del órgano renal y del sistema reproductor femenino y masculino (Paraense, 1982).

El 10% de los caracoles recolectados en cada muestreo fue relajado, sacrificado, fijado y conservado de acuerdo a la metodología descripta por Paraense (1984) y Rangel-Ruiz y Gamboa-Aguilar (2005) como se detalla en el ANEXO 2.

Las conchillas fueron observadas bajo un microscopio estereoscópico con ocular graduado. La Lic. Silvia Pietrokovsky realizó las disecciones para extraer los órganos con valor taxonómico.

El material estudiado se comparó con las descripciones y los dibujos de las especies de lymneidos descriptas para la Región Neotropical (Paraense, 1982; Paraense, 1984) y con las correspondientes a *L. truncatula* (Glöer, 2002).

Aquellos individuos que compartían las características morfológicas con los ya identificados fueron asignados a la misma especie.

Los resultados correspondientes a esta sección se presentan en el **Capítulo 4** (Página 64).

3.4.2.1.2 Abundancia y estructura poblacional

En el laboratorio se contabilizaron los caracoles de la familia Lymnaeidae recolectados en cada muestreo, por ambiente, durante 30 minutos. Como índice de abundancia se utilizó la captura por unidad de esfuerzo (Rabinovich, 1980), definido como el número de ejemplares capturados en 30 minutos.

Para estudiar la estructura y la dinámica poblacional se midió el largo de la conchilla entre el ápex y el margen anterior (Fig. 3.7) de todos los caracoles recolectados durante 2 horas en cada ambiente y por fecha de muestreo. La longitud de la conchilla se midió con un microscopio estereoscópico con ocular graduado. Los caracoles medidos fueron agrupados en las siguientes categorías de tamaño: recién nacidos, juveniles, medianos, grandes y muy grandes. Las primeras dos categorías representan a los caracoles inmaduros sexualmente y las últimas tres a los caracoles adultos. El valor numérico de cada categoría dependerá de la identidad del caracol.

Figura 3.7: Conchilla de lymneido en vista ventral. Línea negra: longitud entre el ápex y el margen anterior. Escala: 5 mm.

Los resultados de esta sección se presentan en el **Capítulo 5, secciones 5.5.2** (Abundancia, Pág. 82) **y 5.5.4** (Estructura poblacional, Pág. 91).

3.4.2.1.3 Infección por *F. hepatica*

Los caracoles vivos que no fueron sometidos a la identificación taxonómica (sección 3.4.2.1.1), se examinaron para detectar la presencia de trematodes en sus vísceras.

Para hallar caracoles infectados con *F. hepatica* se estimuló la emisión de cercarias de acuerdo a la metodología descripta por Souza *et al* (2002) con modificaciones, como se detalla en el Anexo 3.

La identificación de *F. hepatica* se realizó a partir de la observación de las características morfológicas de las cercarias maduras (ver capítulo 1, sección 1.2.2.1) bajo un microscopio óptico (400x).

La identidad de *F. hepatica* se corroboró mediante la determinación molecular de las cercarias y las redias halladas en los caracoles lymneidos y mediante la obtención de adultos en ratas de laboratorio infectadas experimentalmente con las metacercarias (Jones, 2005) obtenidas a partir del enquistamiento de las cercarías emitidas por los caracoles lymneidos recolectados en el establecimiento.
Para la determinación molecular de los estadios larvales de *F. hepatica* se seleccionó al azar el 47% de los caracoles recolectados en otoño del primer período húmedo, que luego del examen parasitológico fueron conservados individualmente en alcohol 70% a 4ºC. Los cuerpos fueron remitidos a la Dra. Silvana Carnevale y a la Lic. Marcela Cucher, del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS ‘‘Dr. Carlos G. Malbran” para la identificación del parásito mediante una técnica de PCR basada en la secuencia del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa de *F. hepatica* (Cucher *et al.*, 2006).
Para la obtención de Fasciolas adultas, 6 ratas Wistar de 21-24 días procedentes del bioterio del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, fueron inoculadas oralmente con 25 metacercarias cada una. A partir del día 30 post-infección se buscaron huevos en la materia fecal de las ratas y los animales positivos fueron disecados para buscar Fasciolas adultas en los ductos biliares. La determinación de las fasciolas adultas se realizó a partir de sus características morfológicas (Jones, 2005).

Los resultados correspondientes a esta sección se presentan en el **Capítulo 6, sección 6.5.2** (página 118).

3.4.2.2 Caracoles no lymneidos

Los caracoles no lymneidos, recolectados simultáneamente con los de la familia Lymnaeidae, fueron identificados a nivel de género y/o de especie, siguiendo las claves y descripciones de los caracoles de agua dulce de Argentina (Castellanos y Landoni, 1981; Paraense, 1975; Rumi, 1991). Los individuos seleccionados para realizar la identificación fueron relajados, matados, fijados y conservados de acuerdo a lo descripto por Paraense (1984) (Anexo 2).

En el laboratorio se determinó el número de caracoles de cada familia recolectados en 30 minutos, por muestreo y por ambiente. Como índice de abundancia se utilizó la captura por unidad de esfuerzo (Rabinovich, 1980) definida como el número de ejemplares capturados en 30 minutos.

Los resultados correspondientes a esta sección se presentan en el **Capítulo 5, sección 5.5.2: Abundancia** (Pág. 82).

3.4.3. Análisis estadístico

Para decidir el tipo de pruebas estadísticas a aplicar primero se chequeó la distribución de todas las variables (temperatura del aire, del agua, precipitación, pH, columna de agua, abundancia y longitud) mediante la prueba de normalidad de Wilk-Shapiro (Sokal y Rohlf, 1969). La falta de normalidad en las variables precipitación mensual, abundancia y longitud del caparazón de los caracoles medidos ($p < 0,05$) estableció el uso de pruebas no paramétricas.

3.4.3.1. Variables ambientales

En cada ambiente se comparó la columna, la temperatura del agua y el pH entre estaciones dentro de cada período mediante las siguientes pruebas no paramétricas para muestras independientes: cuando sólo se compararon dos muestras se utilizó la prueba Mann-Whitney (Daniel, 1990) y cuando el número de muestras a comparar fue mayor a dos se utilizó la prueba de Kruskall-Wallis, y a posteriori, cuando fue necesario, el test de Dunn (Daniel, 1990). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).

3.4.3.2. Abundancia

El coeficiente de correlación de Spearman (Daniel, 1990) se utilizó para analizar la relación entre: 1) la abundancia de los lymneidos y las variables climáticas (temperatura media, máxima y mínima mensual del aire y precipitación mensual); 2) la abundancia de los lymneidos y las variables ambientales (temperatura del agua, pH y profundidad por ambiente) y 3) la abundancia de los lymneidos y la abundancia de los caracoles no lymneidos. En el caso de las variables climáticas los valores correspondieron al mes anterior al muestreo.

La abundancia de los lymneidos se comparó entre períodos mediante una prueba de χ^2 para **proporciones dependientes**. Cuando el número de proporciones a comparar fue igual a dos se utilizó la prueba de χ^2 de bondad de ajuste (Zar, 1999). Para comparar más de dos proporciones se utilizó la prueba de χ^2 de bondad de ajuste para proporciones múltiples y a posteriori, cuando fue necesario, se subdividió la prueba para realizar las múltiples comparaciones de a pares (Zar, 1999). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).
Esta misma prueba se utilizó también para comparar dentro de los períodos húmedos la abundancia de los lymnaeidos a) entre estaciones, b) entre ambientes y c) entre estaciones dentro de cada ambiente. Además, se utilizó para comparar dentro de cada estación la abundancia de los lymneidos con la de los no lymneidos.

3.4.3.3. Estructura poblacional

La distribución de tamaños entre estaciones en los períodos húmedos se comparó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y a posteriori, cuando fue necesario, el test de Dunn (Daniel, 1990). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).

3.4.3.4. Infección

3.4.3.4.1. Infección por *F. hepatica* en lymneidos durante todo el estudio

La prevalencia general y por ambiente se comparó entre períodos mediante la prueba de χ^2 para **muestras independientes**. Cuando el número de muestras a comparar fue igual a dos se utilizó la prueba de χ^2 para dos proporciones independientes (Fleiss, 1981). Cuando

se compararon más de dos proporciones se utilizó la prueba de χ^2 para proporciones múltiples (Fleiss, 1981) y a posteriori, cuando fue necesario, el procedimiento de Tukey para múltiples comparaciones de a pares (Zar, 1999). Estos análisis se realizaron con el programa WINPEPI (Abramson, 2004).
Esta misma prueba se utilizó para comparar dentro del primer período húmedo la prevalencia por *F. hepatica* en lymneidos entre ambientes y entre clases de tamaño.

Durante el primer período húmedo también se comparó la proporción de lymneidos infectados (número de lymneidos infectados/número de lymneidos examinnados) entre ambientes y entre clases de tamaño mediante la prueba de χ^2 para **proporciones dependientes** (Ver sección 3.4.3.2 para especificación del tipo de prueba en función del número de muestras a comparar).

3.4.3.4.2. Infección por *F. hepatica* en lymneidos dentro del primer período húmedo

El coeficiente de correlación de Spearman (Daniel, 1990) se utilizó para analizar la relación entre 1) la prevalencia por *F. hepatica* en lymneidos y su abundancia y 2) la prevalencia por *F. hepatica* en lymneidos y la temperatura mínima, media y máxima del aire.

La prueba de χ^2 para **muestras independientes** se utilizó para comparar:

a) la prevalencia por *F. hepatica* en lymneidos entre estaciones,
b) la prevalencia y la proporción de lymneidos infectados por ambiente entre estaciones,
c) la prevalencia y la proporción de lymneidos infectados por clase de tamaño entre estaciones,
d) dentro de cada estación, la prevalencia la proporción de lymneidos infectados entre ambientes
e) dentro de cada estación, la prevalencia la proporción de lymneidos infectados entre clases de tamaño

Ver sección 3.4.3.4.1. para especificación del tipo de prueba en función del número de muestras a comparar.

El tamaño de los lymneidos infectados con *F. hepatica* en cada estación se comparó mediante las siguientes pruebas no paramétricas para muestras independientes: cuando solo se compararon dos muestras se utilizó la prueba Mann-Whitney (Daniel, 1990) y cuando el número de muestras fue mayor a dos se utilizó la prueba de Kruskall-Wallis, y a posteriori, cuando fue necesario, el test de Dunn (Daniel, 1990). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0 (StatSoft, 2001).

3.5. Dinámica de transmisión

Para analizar la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en el Departamento de Berón de Astrada se integraron los resultados de la prevalencia de infección observada en el ganado bovino y en el caracol hospedador intermediario a lo largo de todo el período de estudio junto con aquellas variables climáticas y ambientales que tuvieron influencia sobre la misma. Para el análisis también se tuvieron en cuenta los tiempos de desarrollo de los estadios larvales de vida libre del parásito en relación con la temperatura y la humedad en el ambiente. Siguiendo con la metodología de análisis aplicada en este trabajo, la dinámica de transmisión fue analizada primero en cada uno de los períodos en los que se dividió el estudio (primer período húmedo, período seco, de recarga y segundo período húmedo) y luego en forma integral.

Capítulo 4

IDENTIFICACIÓN DEL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO DE *Fasciola hepatica*

4.1 Introducción

Los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios en el ciclo de vida de *Fasciola hepatica* pertenecen a la Clase Gastropoda, Subclase Pulmonata, Orden Basommatophora, **familia Lymnaeidae**.

Esta familia representa uno de los grupos con mayor número de especies entre los caracoles de agua dulce (Remigio, 2002) y su sistemática ha sido, históricamente, objeto de controversia (Remigio y Blair, 1997). Hasta hace un tiempo atrás la determinación específica de los miembros de esta familia se basaba exclusivamente en las características morfológicas de la conchilla y de los órganos internos, en particular del aparato reproductor masculino (Malek, 1985). Considerando estos criterios de clasificación, Baker (1908) reconoció 113 especies de lymneidos en América del Norte y dividió a la familia en 7 géneros: *Acella*, *Bulimnea*, *Lymnaea*, *Pleurolimnaea* (taxón fósil), *Pseudosuccinea*, *Radix* y *Galba*. Cuarenta años después Hubendick (1951), luego de una exhaustiva comparación morfológica de la familia a nivel mundial, planteó que resultaba injustificable la subdivisión en géneros o subgéneros debido a la gran uniformidad anatómica encontrada y dejó a *Lymnaea* como único género válido. Este autor reconoció 40 especies válidas entre las que se encuentran *Lymnaea stagnalis*, *Lymnaea palustris* y *Lymnaea truncatula* en la Región Holártica (Europa, Asia, norte de África, norte de América); *Lymnaea cubensis*, *Lymnaea bulimoides* y *Lymnaea columella* en América Central y del Norte; *Lymnaea viatrix*, *Lymnaea diaphana* y *Lymnaea coussini* en América del Sur. La discusión sobre la validez de un único género o de los 7 propuestos por Baker (1908) sigue vigente y genera gran confusión al referirse a las distintas especies ya que éstas pueden ser nombrada de dos, o incluso de tres, maneras diferentes. A modo de ejemplo, el principal hospedador intermediario de *F. hepatica* en Europa ha sido nombrado en trabajos epidemiológicos, moleculares y/o

reproductivos como *Lymnaea truncatula* Müller, 1774, *Galba truncatula* (Müller, 1774) y *Lymnaea (Galba) truncatula* (Abrous *et al.*, 1999; Bargues y Mas-Coma, 1997; Issia *et al.*, 2008).

Algunas especies de la familia Lymnaeidae se diferencian por la forma de sus conchillas, por la forma y el tamaño de sus próstatas o por la relación del largo del pene y el prepucio (Paraense, 1983). Sin embargo, estos caracteres no siempre son suficientes para diferenciar especies emparentadas (Caron *et al.*, 2007), sobre todo en ambientes donde coexisten especies morfoanatómicamente similares.

Con el objetivo de intentar esclarecer la taxonomía y las relaciones dentro de esta familia se desarrollaron técnicas moleculares, citogenéticas, enzimáticas, etc (Jabbour-Zahab *et al.*, 1997; Remigio y Blair, 1997). Las secuencias de ADN de marcadores moleculares conocidos han demostrado ser una muy buena herramienta para diferenciar genética y molecularmente a los integrantes de la familia Lymnaeidae (Bargues *et al.*, 2001). Entre éstas, la secuencia del gen 16S del ARN mitocondrial resultó un buen marcador para la diferenciación y determinación a nivel de especie (Remigio y Blair, 1997) y la secuencia del gen 18S del ADN ribosomal permitió la diferenciación y agrupación de especies a nivel supraespecífico (Bargues y Mas Coma, 1997). Esta clasificación molecular en unidades supraespecíficas permite también analizar a posteriori qué características fenotípicas están asociadas a cada grupo y consecuentemente deducir el valor taxonómico de esas características morfoanatómicas (Bargues y Mas-Coma, 1997). Por ejemplo, en el Altiplano Boliviano, Samadi *et al* (2000) consideraron que el grupo filogenético formado por *L. cubensis-L. truncatula* (Bargues *et al.*, 1997) puede diferenciarse a partir de la forma de la próstata y la relación del largo de la vaina del pene pero no por la forma de la conchilla. En América del Sur las especies *L. columella*, *L. diaphana* y *L. viatrix* pudieron ser identificadas y diferenciadas a partir de características morfológica y moleculares por aplicación de la técnica de PCR-RFLP en la región ITS-1 y en una porción del gen 16S del ADNm (Carvalho *et al*., 2004).

Por lo expuesto anteriormente resulta evidente la necesidad de aplicar distintas técnicas que se complementen entre sí para identificar correctamente a los miembros de la familia Lymnaeidae.

En Argentina, la familia Lymnaeidae está representada por *L. columella* en la Región Noreste (Provincia de Misiones, Corrientes y Entre Ríos; Paraense, 1982), *L. viatrix* principalmente en la Región Centro-Sur (Kleiman *et al.*, 2004; Paraense, 1982), *L. truncatula* en la Provincia de Mendoza (Issia *et al.*, 2008) y *L. diaphana* en la Provincia de Chubut (Pietrokovsky, com. pers.) (Fig. 4.1). Otras dos especies, *L. plicata* (Scott, 1953) y *L. pictonica* (Castellanos y Landoni, 1981) han sido poco citadas y no existe información actualizada.

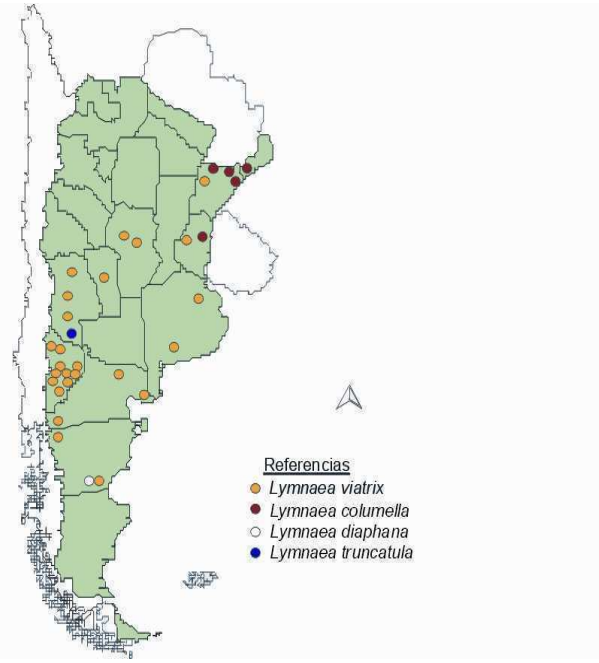


Figura 4.1: Distribución geográfica de las especies de *Lymnaea* en Argentina. Fuente: Scott, 1953; Paraense, 1982; Rossanigo *et al.*, 1983; Kleiman *et al.*, 2004; Issia *et al*., 2008.

Las cuatro especies de *Lymnaea* más estudiadas en Argentina se diferencian entre sí a partir de distintas características. *Lymnaea columella* se distingue de las demás por la forma de su conchilla, por la morfología de su próstata y de su uréter (Paraense, 1983) y a nivel molecular (Duffy *et al.*, 2009). Las otras tres especies presentan conchillas similares entre sí. *Lymnaea diaphana* se diferencia de las otras 2 por el tamaño y la forma de la próstata y por la relación del largo de la vaina del pene y el prepucio (Issia *et al.*, 2008). La diferenciación entre *L. viatrix* y *L. truncatula* es más compleja. Por un lado, Issia *et al*. (2008) las diferencian por la forma de la próstata y la relación del largo pene/prepucio, mientras que Duffy *et al* (2009) confirman su identificación a partir del polimorfismo hallado en la secuencia de la hélice E10-1 de la región variable V2 del gen 18S del ARN ribosomal.

4.2 Objetivo

Identificar morfológicamente al caracol involucrado en la dinámica de transmisión de *Fasciola hepatica* en el Departamento de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina.

4.3 Materiales y métodos

En capítulo 3, sección **3.4**: Hospedador intermediario, punto 3.4.2.1.1

4.4 Resultados

Las características de la conchilla y los órganos internos de los ejemplares de la familia Lymnaeidae recolectados en Berón de Astrada coinciden con las descripciones realizadas por Paraense (1983) para ***Lymnaea columella***, Say 1817 (Fig. 4.2). *Lymnaea columella* fue la única especie de la familia Lymnaeidae hallada en el área de estudio.

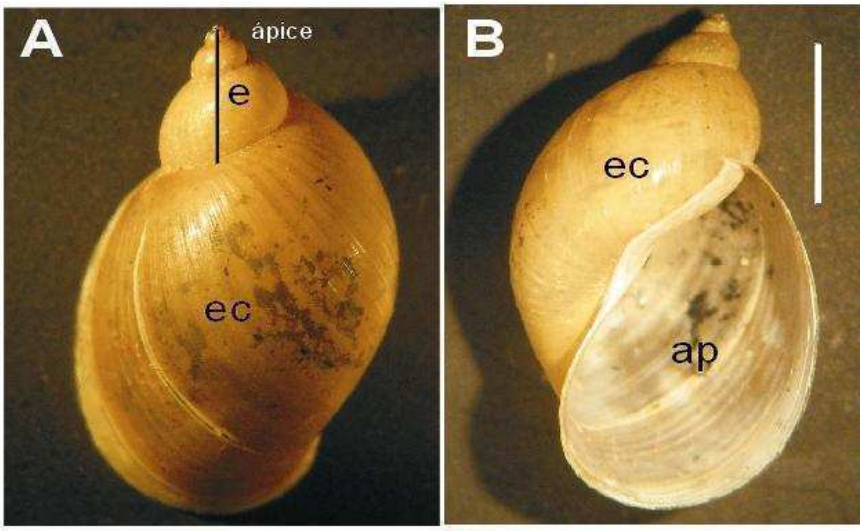
Figura 4.2: Aspecto externo de *Lymnaea columella* proveniente de Berón de Astrada, Corrientes, Argentina

4.4.1 Descripción morfológica

La conchilla de *L. columella* es ovalada y está compuesta por 5 anfractos. El primero de estos anfractos, denominado espira del cuerpo, es muy voluminoso y alcanza una longitud 3 veces mayor que en el resto de los anfractos (Fig. 4.3 A). Los 4 anfractos

restantes se agrupan en la parte distal de la conchilla y forman un espiral corto que termina en un ápice puntiagudo (Fig. 4.3 A). La conchilla posee líneas de crecimiento gruesas atravesadas por líneas espirales finas que le confieren una ornamentación muy característica. La apertura es alargada y ocupa dos tercios de la longitud total (Fig. 4.3 B).

Figura 4.3: Conchilla de *Lymnaea columella* de Berón de Astrada. **A:** vista dorsal, **B:** vista ventral. ec= espira del cuerpo; e= espiral; ap= apertura, Escala: 5 mm



Paraense (1983) identifica a la próstata, a la relación del largo del pene y el prepucio y al órgano renal como los órganos con valor diagnóstico para la identificación de *L. columella*.

En el **aparato reproductor masculino** de *L. columella* la próstata, el ducto seminal deferente y el eferente no se diferencia entre sí, ya que tienen forma de cinta delgada y poseen aproximadamente el mismo ancho (Fig. 4.4 B) y el prepucio es de 2 a 6 veces más largo que la vaina del pene (Fig. 4.4 B,C).

El **aparato reproductor femenino** no posee características distintivas (Paraense, 1983). Está compuesto por una glándula del albumen muy voluminosa que cubre parcialmente el oviducto. Este último, describe una trayectoria aproximadamente circular y se ubica entre la glándula del albumen y glándula nidamental. La vesícula seminal se ubica a la izquierda de la glándula del albumen y posee una apariencia globosa, como si estuviera constituida por pequeños paquetes. A continuación de la glándula nidamental se encuentra el útero de paredes muy finas que se angosta hacia la zona distal y gira hacia la derecha

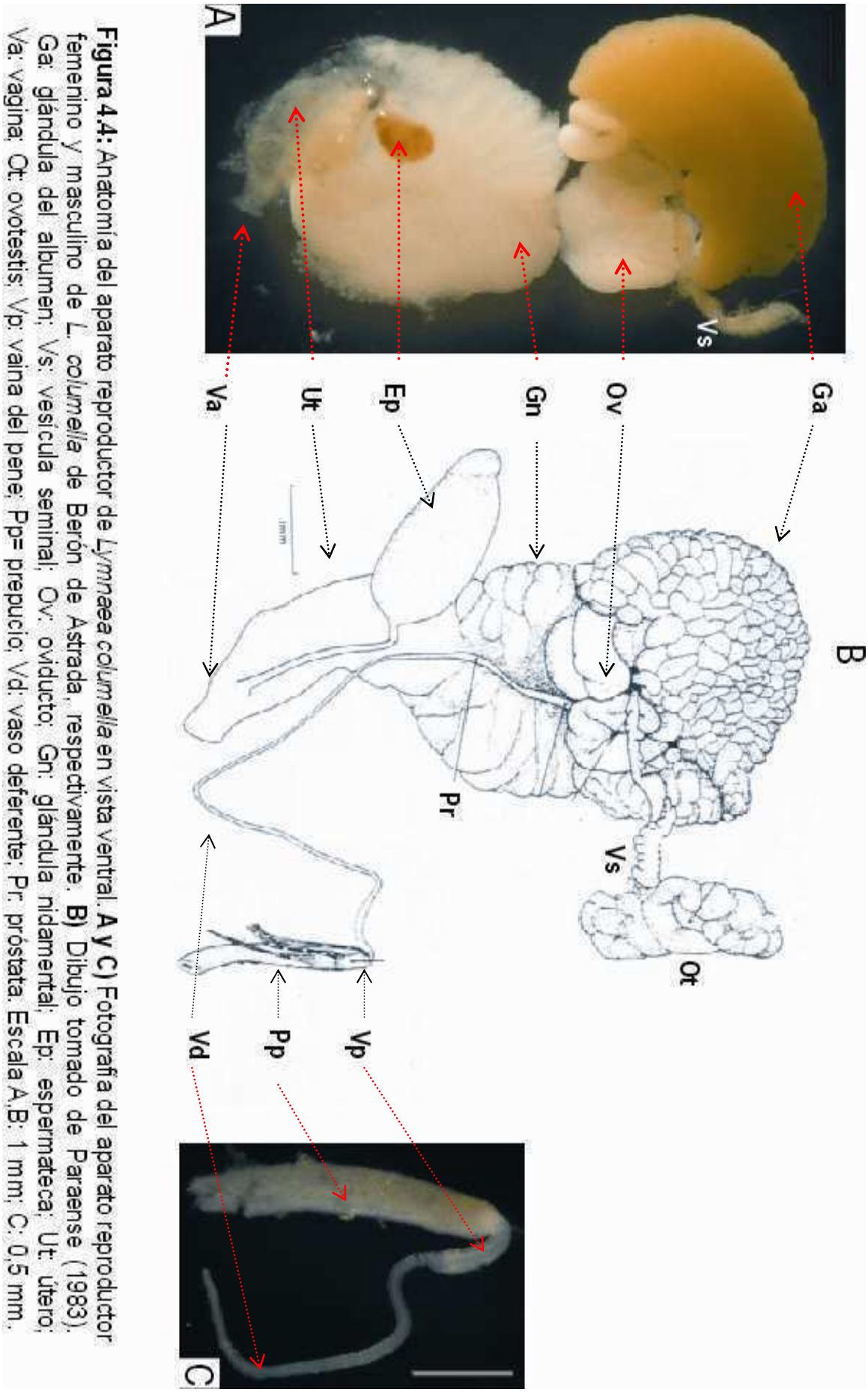
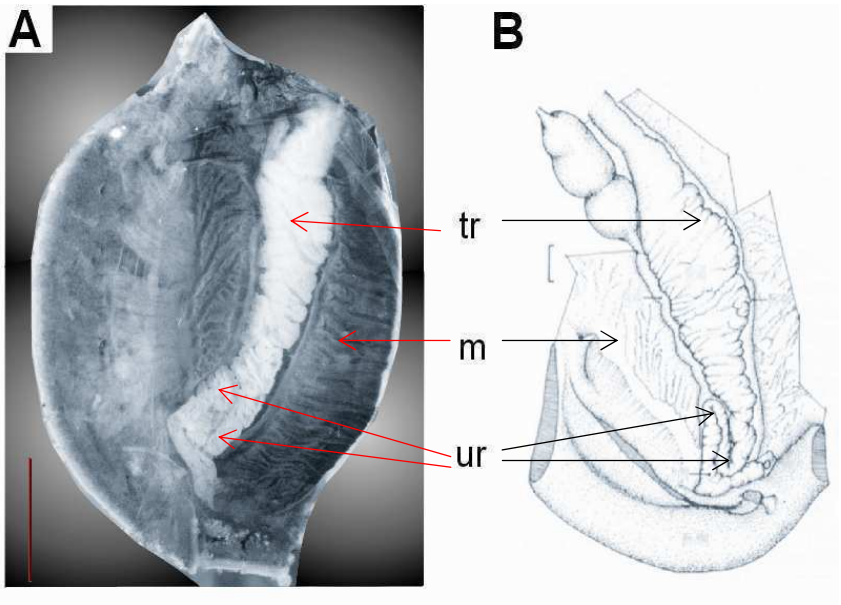


Figura 4.4: Anatomía del aparato reproductor de *Lymnaea columella* en vista ventral. **A y C)** Fotografía del aparato reproductor femenino y masculino de *L. columella* de Berón de Astrada, respectivamente. **B)** Dibujo tomado de Paraense (1983). Ga: glándula del albumen; Vs: vesícula seminal; Ov: oviducto; Gn: glándula nidamental; Ep: espermateca; Ut: útero; Va: vagina; Ct: ovotestis; Vp: vaina del pene; Pp= prepucio; Vd: vaso deferente; Pr: próstata. Escala A,B: 1 mm; C: 0,5 mm.

para continuar en la vagina. La espermateca que puede adoptar distintas formas se localiza a la izquierda de la vagina y posee color anaranjado (Fig. 4.4 A,B).

El **órgano renal** de *L. columella* se extiende en forma lineal por el lado derecho del pericardio a través del manto. En su porción distal, el uréter describe un recorrido en forma de "S" o de doble flexión y luego gira hacia la derecha de forma tal que la abertura termina en el pneumostoma (Fig. 4.5 A,B).

Figura 4.5: Anatomía del órgano renal de *Lymnaea columella* en vista ventral. **A)** Fotografía de *L. columella* de Berón de Astrada. **B)** Dibujo tomado de Paraense (1994). tr: tubo renal, m: manto, ur: uréter. Escala A: 2 mm; B: 0,5 mm.



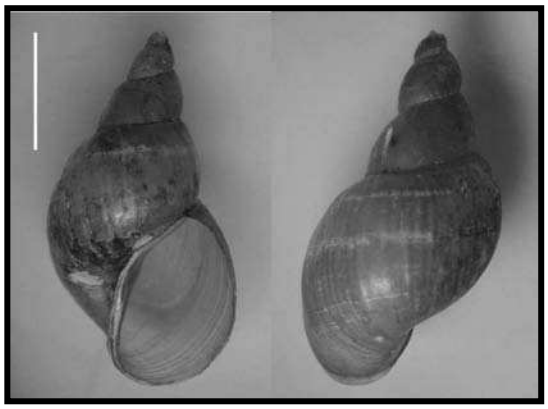
La descripción del resto de los órganos internos puede leerse en Paraense (1983).

4.4.2 Comparación con otros lymneidos de Argentina

La comparación entre los ejemplares de *L. columella* de Berón de Astrada y ejemplares fijados de *L. viatrix, L. diaphana* y *L. truncatula* de Argentina, mostró las siguientes diferencias morfológicas:

Conchilla: La conchilla de *L. columella* posee una espira del cuerpo (o primer anfracto) mucho más desarrollada que la de *L. viatrix, L. diaphana* y *L. truncatula*, y su apertura ocupa 2/3 del largo total de la conchilla, mientras que en las otras especies, ocupa sólo la mitad del largo total (Fig. 4.6) (Paraense, 1983).

Figura 4.6: Conchilla de *Lymnaea diaphana* de Sarmiento, Chubut, Argentina (cortesía de Silvia Pietrokovsky). Escala: 5mm



Uréter: El uréter en *L. columella* posee una doble flexión mientras que en *L. viatrix*, *L. truncatula* y *L. diaphana* el uréter sólo se curva hacia la derecha (Paraense, 1984).

Próstata: La próstata de *L. columella* tiene forma de cinta y no se diferencia del vaso deferente ni del eferente. En las otras especies la próstata es una expansión alargada, ovalada o achatada, más ancha que los ductos deferente y eferente (Issia *et al.*, 2008; Paraense, 1983).

Relación pene/prepucio: En *L. columella* el prepucio es de 2 a 6 veces más largo que la vaina del pene, mientras que en *L. viatrix* es de 1 a 3 veces más largo (Paraense, 1984), en *L. diaphana* de 1 a 2 veces más largo (Paraense, 1984) y en *L. truncatula* de 4 a 5 veces más largo (Issia *et al.*, 2008).

4.5 Discusión

Lymnaea columella es una especie fácilmente distinguible de las otras especies del género presentes en Argentina (*L. viatrix*, *L. diaphana* y *L. truncatula*) por sus características morfológicas. Además, presenta un patrón único y muy diferente al de las otras especies de *Lymnaea* en la secuencia de la hélice E10-1 de la región variable V2 del gen 18S del ARN ribosomal analizada por PCR-Real time (Duffy *et al*., 2009), en la secuencia de la región ITS-1 y de una porción del gen 16S del ARNm analizadas por PCR-RFLP (Carvalho *et al.*, 2004). Esto permite afrmar que indudablemente los caracoles lymneidos estudiados en Berón de Astrada son sin lugar a dudas *Lymnaea columella*.

Lymnaea columella fue descripta originalmente por Say (1817). Baker (1908) propone la creación del género *Pseudosuccinea* y establece a *L. columella* como su especie tipo. Desde entonces no ha habido acuerdo entre investigadores de distintas disciplinas sobre la localización genérica de esta especie, ya que algunos la ubican dentro del género *Lymnaea* (Coelho y Lima, 2003; Paraense, 1982), otros dentro del género *Pseudosuccinea* (Gutiérrez *et al*., 2001; Pointier *et al*., 2007) y otros la nombran utilizando ambos géneros *Lymnaea* (*Pseudosuccinea*) (Dacal *et al*., 1988; Malek y Cogswell, 1980). En esta tesis se ha decidido nombrarla como *Lymnaea columella* en coincidencia con Hubendick (1951).

Las actividades humanas son las principales causas de la invasión de moluscos dulceacuícolas en ambientes acuáticos y este fenómeno se ha incrementado en las últimas décadas producto del aumento del comercio de plantas y peces entre acuarios alrededor del mundo (Pointier *et al.*, 2007). Mediante este mecanismo se cree que distintas especies de caracoles de la familia Lymnaeidae han invadido nuevas regiones y se han establecido mas allá de sus áreas de distribución natural (Madsen y Frandsen, 1989). Este es el caso de *L. columella* que por su gran capacidad de colonización y de expansión en áreas nuevas ha logrado establecerse en muchísimos países alrededor del mundo. Esta especie fue descripta por primera vez en Estados Unidos, presumiblemente en el estado de Filadelfia (Say, 1817) y desde entonces se ha expandido por todo el continente Americano (Malek, 1985). En América Central ha sido hallada en Cuba (Gutiérrez *et al.*, 2003), Islas de Guadalupe (Durand *et al.*, 2002), Puerto Rico, Méjico, Jamaica, Guatemala, Costa Rica y Panamá (Paraense, 1982). En Sudamérica, *L. columella* fue introducida en Ecuador, Brasil (Paraense, 1982), Colombia (Salazar *et al.*, 2006), Venezuela (Malek y Chrosciechowski, 1964), Paraguay, Argentina (Paraense, 1982; Scott, 1953), Uruguay (Heinzen *et al.*, 1994) y Perú (Larrea *et al.*, 2007). También ha sido introducida en otros continentes como Oceanía,

donde se la encontró en las islas de la Polinesia Francesa (Pointier y Marquet, 1990), en Nueva Zelanda (Harris y Charleston, 1977b) y en Australia (Boray *et al*., 1984); en África, donde se la encontró en Sudáfrica (Appleton, 2003), Egipto, Kenya y Zambia (Madsen y Frandsen, 1989), y finalmente en Europa, donde se la ha citado en Francia (Pointier *et al.*, 2007), Países Bajos (Malek, 1985), Suiza, Dinamarca, Alemania y Polonia (Madsen y Frandsen, 1989).

Su gran poder de colonización pudo corroborarse en Sudáfrica donde *L. columella* es la especie colonizadora más exitosa entre los caracoles dulceacuícolas que invadieron ese país en los últimos años y actualmente ocupa el tercer lugar entre las especies de caracoles de agua dulce con mayor distribución (DeKock *et al.*, 1989).

La invasión de *L. columella* no sólo amplia su distribución geográfica sino que puede tener consecuencias en la expansión de la fasciolosis. En Nueva Zelanda, donde *L. columella* fue introducida en la década del 60, rápidamente colonizó gran parte del país y desplazó a la especie nativa, *Lymnaea tomentosa* como principal hospedador intermediario de *F. hepatica*, ampliando considerablemente la distribución de la fasciolosis y provocando cambios en la epidemiología de la misma (Harris y Charleston, 1976). En Australia la especie nativa, *L. tomentosa*, es un hospedador intermediario más eficiente que *L. columella* (Boray *et al.*, 1984), pero como estas dos especies se desarrollan en ambientes distintos, existe el riesgo de que *L. columella* participe en la transmisión del parásito en los ambientes donde la especie nativa no se desarrolla, ampliando la distribución de la parasitosis hacia zonas históricamente libres del parásito (Boray *et al.*, 1984).

Lymnaea columella ha demostrado ser un efectivo hospedador intermediario de *F. hepatica* tanto en condiciones naturales como experimentales. Su rol en la transmisión del parásito en condiciones naturales ha sido confirmado en Brasil (Amato *et al.*, 1986; Coelho y Lima, 2003), Uruguay (Heinzen *et al.*, 1994), Perú (Larrea *et al.*, 2007), Colombia (Salazar *et al.*, 2006), Nueva Zelanda (Harris y Charleston, 1976) y Australia (Boray *et al.*, 1984). Experimentalmente se ha logrado infectar a *L. columella* con miracidios de *F. hepatica* en Cuba (Gutiérrez *et al.*, 2003), Puerto Rico (León-Dancel, 1970), Francia (Pointier *et al.*, 2007) y Sudáfrica (Van Eeden y Brown, 1966 citado en Malek y Cogswell, 1980).

La información sobre la biología y la ecología de *L. columella* es muy escasa. Los pocos trabajos desarrollados en este tema coinciden en que las siguientes características biológicas y ecológicas son las que le permiten a esta especie adaptarse y establecerse exitosamente en ambientes nuevos y con distintas condiciones (DeKock *et al.*, 1989): su capacidad para reproducirse por autofecundación (DeKock *et al.*, 1989), su alto potencial reproductivo y su tolerancia a un amplio rango de temperaturas (Harris y Charleston, 1977c),

su carácter más acuático (Boray *et al.*, 1984; Harris y Charleston, 1977b), su tolerancia a un amplio rango de condiciones de salinidad y pH (DeKock *et al.*, 1989), entre otras.

En Argentina, *Lymnaea columella* es una especie introducida que posee actualmente una distribución acotada a la región noreste, pero que debido a su gran capacidad de colonización y adaptación a nuevos ambientes y a su tolerancia a un amplio rango de temperaturas podría expandirse rápidamente hacia otras zonas de Argentina con características topográficas, climáticas y ambientales favorables para su desarrollo. Estas nuevas zonas podrían ser regiones no habitadas por otro lymneido o con presencia de otras especies de lymneidos bien establecidas como *L. viatrix*, *L. truncatula* o *L. diaphana*. A su vez, su comprobada capacidad para transmitir satisfactoriamente a *F. hepatica* (ver párrafo anterior) y el antecedente de haber desplazado a los lymneidos nativos como principales hospedadores intermediarios del parásito en otros países (Harris y Charleston, 1976), permitiría suponer que esta especie podría ampliar la distribución de la fasciolosis en Argentina hacia zonas donde antes no se registraban casos, o podría aumentar los niveles de infección en zonas donde ésta ya está instalada, al aumentar el número de caracoles susceptibles. Las especulaciones sobre estos posibles escenarios refuerzan la necesidad estudiar las características biológicas y ecológicas más importantes de esta especie en Argentina.

En este Capítulo se ha identificado morfológicamente al caracol que actúa como hospedador intermediario de *F. hepatica* en el norte de la Provincia de Corrientes. Distintos aspectos sobre su biología, su ecología y su dinámica poblacional serán estudiados en el capítulo siguiente (Capítulo 5) y esta información junto con la obtenida en el Capítulo 6 sobre su rol como hospedador intermediario, permitirán conocer la epidemiología de la fasciolosis en el área de estudio y diseñar medidas de control efectivas.

4.6 Conclusiones

Lymnaea columella es la única especie de la familia Lymnaeidae hallada en el área de estudio y esto la convertiría en un potencial hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* a nivel local,

Lymnaea columella se diferencia fácilmente de las otras especies de lymneidos presentes en Argentina (*L. viatrix*, *L. diaphana* y *L. truncatula*) tanto por su aspecto externo (morfología de la conchilla) como por su anatomía interna (morfología de la próstata, el uréter y la relación pene/prepucio),

Lymnaea columella es una especie introducida en Argentina que posee actualmente una distribución restringida a la Región Noreste, pero dadas sus características biológicas podría ampliar su distribución hacia otras zonas del país con condiciones topográficas, climáticas y ambientales favorables para su desarrollo,

Capítulo 5

ABUNDANCIA, DINÁMICA POBLACIONAL Y ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Lymnaea columella*

5.1 Introducción

El conocimiento de la ecología y la biología de los caracoles de la familia Lymnaeidae es esencial para comprender la epidemiología de la fasciolosis y diseñar estrategias efectivas de control. En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos sobre esta parasitosis (Boray, 1981; Buchon *et al.*, 1997; Malone, 1994; Ollerenshaw, 1971b) pero muy pocos se han focalizado en la ecología del hospedador intermediario en condiciones naturales (Boray, 1969; Cruz-Mendoza *et al.*, 2004; Kleiman *et al.*, 2007; Malone *et al.*, 1984).

Las poblaciones de caracoles dulceacuícolas, entre los que se encuentran los lymneidos, están sujetas a una gran cantidad de limitaciones ecologías impuestas en gran medida por las enormes fluctuaciones temporales que sufre el ambiente donde viven (Gérard, 2001). La presencia, la abundancia y la estructura y la dinámica poblacional de éstos organismos resulta de la interrelación entre las propiedades intrínsecas de cada especie y las propiedades extrínsecas del hábitat, tanto bióticas como abióticas (Krasnov *et al.*, 2006). Entre los factores bióticos, la predación y la competencia ínterespecífica son reconocidos como los más importantes en la estructuración de las poblaciones (Dillon, 2000). En relación a los factores abióticos, la temperatura y la precipitación son considerados los factores más limitantes (Ollerenshaw, 1971a; Torgerson y Claxton, 1999) y su importancia relativa puede variar espacial y temporalmente. La **temperatura** es un factor crítico para la ecología y la biología de la mayoría de los organismos poiquilotermos, ya que afecta directamente la tasa de crecimiento, la edad de maduración sexual y la fecundidad (Islam *et al.*, 2001) y puede inhibir o acelerar muchos procesos biológicos (Claxton *et al.*, 1999). Por su parte, la **humedad** también resulta fundamental para la vida de estos

caracoles que sólo pueden desarrollarse en suelos húmedos y saturados de agua (Ollerenshaw, 1971b).
En particular, los caracoles de la familia Lymnaeidae se desarrollan y reproducen en forma óptima cuando la temperatura oscila entre 10ºC y 30ºC y cuando el suelo contiene suficiente humedad (Torgerson y Claxton, 1999). Cuando las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, ya sea porque aumenta o disminuye mucho la temperatura o por que el ambiente se seca, los lymneidos son capaces de sobrevivir estivando durante las sequías e hibernando durante los meses fríos, permaneciendo en ambos casos en estado de latencia (Boray, 1969). La supervivencia luego de la **estivación** dependerá de la resistencia de los caracoles a la desecación, la cual está influenciada principalmente por la duración de la sequía, por la temperatura y por el tamaño de los caracoles (Harris y Charleston, 1977a). Los lymneidos suelen estivar enterrándose en la tierra o retrayéndose en su conchilla mientras permanecen sobre el suelo o sobre barro, tallos, troncos, ramas caídas, dentro de grietas o pequeñas depresiones en el suelo o incluso sobre matas de vegetación acuática seca (Jokinen, 1978).

Las poblaciones de lymneidos presentan tasas de reproducción y crecimiento muy altas cuando las condiciones ambientales son favorables y se mantienen en el tiempo (Islam *et al.*, 2001). En condiciones naturales, donde las variables climáticas fluctúan continuamente y se produce una alternancia de períodos favorables y desfavorables, la dinámica poblacional de estos caracoles es de tipo “crash-boom”, con crecimientos explosivos cuando las condiciones son adecuadas y disminuciones drásticas en las épocas desfavorables (Malone *et al.*, 1984). La recuperación de las poblaciones que han sido afectadas numéricamente suele ser rápida debido a que son hermafroditas y capaces de reproducirse por fecundación cruzada o autofecundación (Dillon, 2000), lo cual permite que con unos pocos individuos maduros sexualmente se asegura la continuidad de la población.

Si bien la familia Lymnaeidae posee una distribución cosmopolita, muchas de las especies están restringidas por las características que debe tener su hábitat (Malek, 1985), entendiéndose como tal al espacio que reúne las condiciones adecuadas para que la especie pueda residir y reproducirse, perpetuando su presencia (Southwood, 1977). El hábitat de estos caracoles es muy variable ya que algunas especies viven en zonas pantanosas, en bordes de lagos y lagunas o parches abiertos cerca de las costas, otras prefieren charcos con agua estancada y presencia de vegetación y otras viven en los márgenes de ríos, arroyos y lagunas, sobre el fango que bordea las costas o sobre palos, piedras y restos de vegetación (Malek, 1985). Algunas especies presentan hábitos más

acuáticos, como *Lymnaea columella* (Harris y Charleston, 1977b) y otras más anfibios o terrestres, como *Lymnaea viatrix* (Kleiman *et al.*, 2007).

Lymnaea columella fue identificada como el único representante de la familia Lymnaeidae en la zona de estudio (Capítulo 4). En Argentina no existen estudios sobre aspectos biológicos y ecológicos de esta especie en condiciones naturales ni experimentales. La información sobre *L. columella* proviene de los pocos trabajos realizados a nivel mundial, en su mayoría en Brasil (Amato *et al.*, 1986; Coelho y Lima, 2003), Cuba (Calienes *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2003) y Nueva Zelanda (Harris y Charleston, 1976).
En algunos trabajos realizados en condiciones naturales se observó que *L. columella* presenta una dinámica poblacional anual y cíclica, con mayores abundancias y predominancia de caracoles adultos en los meses más fríos y secos y un descenso de la abundancia durante los meses más calurosos y lluviosos (e.g. Amato *et al.*, 1986; Heinzen *et al.*, 1994; León-Dancel, 1970; Oliveira *et al.*, 2002). En otros trabajos no se encontró un patrón estacional de la abundancia y la estructura poblacional (Cañete et al., 2004; Coelho y Lima, 2003). Según Maure *et al* (1998) y Amato *et al* (1986) *L. columella* puede producir 2 generaciones por año, una en verano (enero-marzo) y otra en invierno (junio-octubre), mientras que Mattos *et al* (1997) y Appleton (1974) registraron una única generación anual. En su ambiente natural, la longevidad máxima registrada en *L. columella* fue de 15 meses (Appleton, 1974) y el largo máximo de la conchilla fue de 20 mm (Silva Santos *et al.*, 1987).

Bajo condiciones controladas de laboratorio, la mayor longevidad de *L. columella* fue de 183 días y el tamaño máximo de 21,5 mm (Souza y Magalhães, 2000). También se observó que *L. columella* posee una alta tasa de reproducción, ya que cada individuo puede poner en promedio 2352 huevos durante su vida fértil, que dura aproximadamente 98 días (Gomes *et al.*, 1975). A su vez, caracoles criados en aislamiento producen más huevos que los criados de a pares, corroborando la capacidad de *L. columella* para reproducirse por autofecundación (Gutiérrez *et al.*, 2002b). El tamaño al cual *L. columella* alcanza la madurez sexual y comienza a poner huevos oscila entre 4 y 9 mm, según lo informado por distintos autores (Appleton, 1974; Gomes *et al.*, 1975; Harris y Charleston, 1977c; Souza y Magalhães, 2000). Además, se observó que las *L. columella* de tamaño grande resisten mejor la desecación y por más tiempo en comparación con las pequeñas (Harris y Charleston, 1977a).

5.2 Objetivos

a) Estudiar aspectos biológicos de *Lymnaea columella* en la zona de estudio,

b) Caracterizar los ambientes habitados por *L. columella* a partir de sus variables ambientales,

c) Describir la abundancia de *L. columella* por ambiente y a lo largo del tiempo por estaciones climáticas,

d) Describir la estructura y la dinámica poblacional de *L. columella* a lo largo del tiempo por estaciones climáticas,

e) Analizar la influencia de factores bióticos y abióticos en la abundancia y la dinámica poblacional de *L. columella*,

f) Determinar el impacto en la abundancia y la dinámica poblacional de *L. columella* durante y después de una sequía de 6 meses de duración

5.3 Hipótesis

1) *Lymnaea columella* se encuentra bien establecida en la zona de estudio, conformando poblaciones abundantes y estables durante todo el año, ya que encuentra en los distintos tipos de ambientes (Bañados y Malezales del Macrosistema del Iberá) las condiciones y recursos necesarios para alimentarse, crecer y reproducirse. A su vez, se adapta a las fluctuaciones ambientales y climáticas mediante estrategias de supervivencia que le aseguran su permanencia en el tiempo.

2) La abundancia y la dinámica poblacional de *L. columella* están moduladas por el nivel de agua en los humedales y por la temperatura.

5.4 Metodología (en Capítulo 3, secciones **3.2**: Variables climáticas y **3.4**: Hospedador intermediario).

5.5 Resultados

Los períodos en los que se dividió el estudio: primer período húmedo (1º PH), período seco, período de recarga y segundo período húmedo (2º PH), presentaron condiciones climáticas muy distintas (Figura 3.2), razón por la cual se decidió analizar a cada uno en forma separada. Sin embargo, los análisis estadísticos sólo pudieron realizarse con los datos de los períodos húmedos ya que en el período seco y en el de recarga se realizaron pocos muestreos (1 y 2, respectivamente). Dentro de cada período húmedo los muestreos se agruparon por estación.

Como es de esperar para un clima subtropical en los períodos húmedos la mayor temperatura media del aire se registró en verano (25,7 ºC), luego en primavera (21,5 ºC), otoño (21,0 ºC) e invierno (16,3 ºC). La mayor precipitación media estacional se registró en otoño (239,9 mm), luego en primavera (164,0 mm), en verano (117,3 mm) y en invierno (52,1 mm).

5.5.1 **Ambientes**

Se encontraron ejemplares de *Lymnaea columella* en los 3 ambientes estudiados, a saber el borde del Bañado, los canales anchos del Malezal y los canales angostos del Malezal. En la Tabla 5.1 se muestran los valores mínimos y máximos absolutos de la temperatura instantánea del agua y el pH y la media de la columna de agua, registrados durante todo el período de estudio en los sitios de muestreo de cada ambiente (8 en el borde del Bañado, 10 en los canales anchos y 8 en los canales angostos del Malezal).

La **temperatura instantánea del agua** no mostró variaciones importantes entre los sitios de muestreos de un mismo ambiente, en ninguno de los muestreos realizados. En los 8 sitios de muestreo del borde del Bañado la diferencia entre el mayor y el menor valor absoluto osciló entre 0,5℃ (I del período de recarga) y 3,5 ℃ (P del período de recarga). En los 10 sitios de muestreo de los canales anchos del Malezal la diferencia osciló entre 0,2℃ (O del 2º PH) y 3,1℃ (P del período de recarga e I del 2º PH). En los 8 sitios de muestreo de los canales angostos del Malezal la diferencia fue de entre 0,6℃ (O del 2º PH) y 3,0℃ (P del 2º PH). Por ejemplo, como se observa en la Tabla 5.1, en el muestreo de otoño del 2º PH la temperatura del agua osciló entre 19,4 y 22,0℃ en el borde del Bañado (diferencia: 2,6), entre 20,7 y 20,9℃ en los canales anchos (diferencia: 0,2) y entre 20,5 y 21,6 en los canales angostos (diferencia: 1,1). Estas diferencias podrían considerarse despreciables

frente al amplio rango de temperaturas a la cual se desarrollan los caracoles de la familia Lymnaeidae (10-30℃; Torgerson y Claxton, 1999), y permitiría suponer que no se encontrarán diferencias en la biología de *L. columella* entre los sitios de muestreos de un mismo ambiente.

El **pH** tampoco difirió entre los sitios de muestreos de un mismo ambiente ya que la diferencia entre el menor y el mayor valor osciló entre 0,1 y 1 en todos los ambientes y en todos los muestreos (Tabla 5.1). Esta variación probablemente tampoco afecte la biología de estos caracoles cuya actividad se desarrolla en ambientes donde el pH oscila entre 5 y 8,6 (Van Someren, 1946).

Tabla 5.1: Valores de las variables ambientales registradas en el borde del Bañado, en los canales anchos y en los canales angostos del Malezal.

			Períodos	Primer húmedo						Seco	Recarga		Segundo húmedo				
				2002	2003				2004				2005				
Humedal	Ambiente	Variable		P	V	O	I	P	V	O	I	P	P	V	O	I	P
Bañado	Borde del Bañado (n=8)	TA	Mín	23,5	25,1	14,3	24,0	21,0	33,1		23,5	21,0	24,3	33,2	19,4	24,5	24,0
			Máx	24,4	26,4	17,5	25,0	22,5	34,0		24,0	24,5	25,2	36,4	22,0	26,0	27,0
		pH	Mín	7,0	7,8	5,5	7,0	--	5,7	S	--	6,7	--	6,0	5,0	6,0	6,0
			Máx	7,0	7,8	5,5	7,0	--	5,7		--	6,8	--	7,0	6,0	7,0	7,0
		CA	Med	26,5	23,7	12,8	7,5	18,3	1,0		9,9	19,7	65,0	7,6	34,2	15,9	60,0
			DE	1,5	1,2	2,3	5,1	2,6	0,4		1,3	9,2	5,0	6,0	18,4	11,3	0,0
Malezal	Canal ancho (n=10)	TA	Mín	22,1	25,3	17,0	22,0	23,0				22,5	23,2		20,7	26,0	22,5
			Máx	23,2	26,2	20,0	24,5	24,0				25,6	24,5		20,9	29,1	25,4
		pH	Mín	7,6	6,0	5,0	6,0	--	S	S	S	6,7	--	S	5,0	6,0	6,0
			Máx	7,6	6,0	6,0	6,5	--				6,7	--		6,0	6,0	6,0
		CA	Med	32,0	12,0	14,9	9,5	19,5				17,2	38,3		26,8	15,3	21,8
			DE	4,1	1,6	2,7	5,8	3,3				4,7	6,2		9,3	5,6	11,6
	Canal angosto (n=8)	TA	Mín	25,1	25,8	18,0	20,0	--				18,5	22,9		20,5	25,4	22,4
			Máx	26,6	28,5	19,6	21,5	--				21,0	24,3		21,6	26,0	25,4
		pH	Mín	7,7	6,0	6,0	6,5	--	S	S	S	6,0	--	S	5,0	--	6,0
			Máx	7,7	7,0	6,0	6,5	--				6,0	--		6,0	--	6,0
		CA	Med	25,5	15,0	9,8	4,3	--				7,6	22,5		23,7	9,0	14,3
			DE	1,5	5,0	0,3	4,2	--				1,6	2,5		1,2	1,0	3,7

Referencias: n: sitios de muestreos; TA: temperatura del agua (ºC); CA: altura de la columna de agua (cm),
Mín: mínimo; Máx: máximo; Med: media; DE: Desvío Estándar; P: primavera; V: verano; O: otoño; I: invierno; S: seco; --: sin dato

Con respecto al tipo de vegetación, en el borde del Bañado se hallaron principalmente plantas acuáticas enraizadas (*Pontederia lanceolata*) y flotantes (*Pistia* sp y *Lemna* sp), en los canales anchos del Malezal se hallaron plantas acuáticas flotantes (*Pistia* sp) y raíces de los pastos que crecen sobre los montículos que conforman el Malezal (*Andropogon lateralis* y otras especies del género *Andropogon*), siendo estas últimas la única vegetación presente

de los canales angostos del Malezal. En el borde del Bañado las plantas acuáticas ocupaban el 50% de la superficie y en los canales anchos el 10%.

La **columna de agua** mostró variaciones entre los sitios de muestreo de un mismo ambiente en unas pocas estaciones, como puede observarse por el elevado valor del desvío estándar, por ejemplo en otoño del 2º PH en el borde del Bañado (DE= 18,4) o en primavera del 2º PH en los canales anchos del Malezal (DE= 11,6) (Tabla 5.1). Seguramente, esto se deba a que el fondo de estos ambientes es muy irregular y con depresiones, las cuales podrían estar asociadas con el pisoteo de los animales.

La poca variabilidad de la temperatura del agua, el pH, el tipo de vegetación y su cobertura entre los sitios de muestreo de cada ambiente permite considerar que cada ambiente es homogéneo. Debe resaltarse que las mediciones de éstas variables se realizaron en forma instantánea y en el transcurso de un par de horas, por lo cual si los sitios de muestreo no fueran homogéneos, hubiera sido esperable encontrar diferencias importantes en la temperatura del agua y el pH. Esta homogeneidad de los ambientes permite agrupar los sitios de muestreo dentro de cada uno de ellos y considerar sólo el tipo de ambiente, según se trate del borde del Bañado, de los canales anchos o de los canales angostos del Malezal.

El Bañado y Malezal, que son humedales temporarios, estuvieron completamente secos al menos durante una estación a lo largo del período de estudio; el Bañado se secó en otoño del período seco y el Malezal además estuvo seco en verano (2003) del 1º PH, en invierno del período de recarga y en verano del 2º PH (Tabla 5.1).

El **borde del Bañado** fue el ambiente donde las variables ambientales mostraron mayor oscilación entre estaciones, ya que la temperatura del agua osciló entre 14,3 y 36,4ºC, el pH entre 5,0 y 7,8 (Tabla 5.1) y la columna de agua entre 0,5 cm (V2005 del 1º PH) y 70 cm (P2004 del 2º PH). En la Figura 5.1 se muestran las variaciones estacionales de la temperatura y la columna del agua durante los períodos húmedos. La temperatura del agua difirió significativamente entre estaciones en el 1º PH y en el 2º PH ($H_{(3)}$= 15,5, p= 0,001 y $H_{(3)}$= 13,3, p= 0,004, respectivamente) (Fig. 5.1 A.1,2). Las comparaciones de a pares mostraron que en ambos períodos, la temperatura del agua en verano fue significativamente mayor que en otoño ($p< 0,05$) y que en el resto de la estaciones no se encontraron diferencias significativas ($p> 0,05$). La columna de agua no difirió entre estaciones durante el 1º PH ($p> 0,05$) (Fig. 5.1 B.1) pero sí lo hizo en el 2º PH ($H_{(3)}$= 16,8, p= 0,001), cuando en primavera fue significativamente mayor que en invierno y en verano ($p< 0,05$) (Fig. 5.1 B.2).

En los **canales anchos del Malezal** la temperatura del agua osciló entre 17 y 29,1ºC, el pH entre 5 y 7,6 (Tabla 5.1) y la columna de agua entre 0,5 cm (I del 1º PH) y 45 cm (P2004 del 2º PH). La Figura 5.2 muestra las variaciones estacionales de la temperatura y la columna del agua durante los períodos húmedos. La temperatura del agua difirió significativamente entre estaciones en el 1º PH y en el 2º PH ($H_{(3)}$= 14,0, p= 0,003 y $H_{(2)}$= 8,7, p= 0,01, respectivamente) (Fig. 5.2 A.1,2). Durante el 1º PH la temperatura del agua en verano y en primavera fue significativamente mayor que la de otoño (p< 0,05), mientras que en el 2º PH, la temperatura del agua en invierno resultó significativamente mayor que la de otoño (p< 0,05). La columna de agua no difirió entre estaciones durante el 2º PH (p> 0,05) (Fig. 5.2 B.2) pero sí lo hizo en el 1º PH ($H_{(3)}$= 18,9, p< 0,001), cuando la columna de agua en primavera fue mayor que en invierno y verano (p< 0,05) (Fig. 5.2 B.1).

En los **canales angostos del Malezal** la temperatura del agua osciló entre 18 y 28,5ºC, el pH entre 5 y 7,7 (Tabla 5.1) y la columna de agua entre 0,5 cm (I del 1º PH) y 27 cm (P2002 del 1º PH). La Figura 5.3 muestra las variaciones estacionales de la temperatura y la columna de agua durante los períodos húmedos. La temperatura del agua no difirió entre estaciones durante el 1º PH (p> 0,05) (Fig. 5.3 A.1) pero sí lo hizo en el 2º PH ($H_{(2)}$= 8,4, p= 0,01) (Fig. 5.3 A.2), cuando la temperatura del agua en invierno fue significativamente mayor a la de otoño (p< 0,05). La columna de agua no mostró diferencias significativas entre estaciones en ninguno de los períodos húmedos (p> 0,05 para ambos) (Fig. 5.3 B.1,2).

El pH no difirió entre estaciones en ninguno de los períodos húmedos, en ninguno de los ambientes (p> 0,05 en todos los casos).

En primavera, como consecuencia del aumento en las precipitaciones (Fig. 3.2), aumentó también la columna de agua en el Bañado (Fig. 5.1 B.1,2) y en el Malezal (Fig. 5.2 B.1,2 y Fig. 5.3 B.1,2), quedando ambos humedales desbordados e interconectados. Esta situación permitió considerar que todos los ejemplares de *L. columella* hallados en la zona de estudio pertenecen a una única población, cuyos individuos pueden dispersarse libremente entre los ambientes estudiados cuando estos están conectados.

Figura 5.1: Borde del Bañado. Variaciones estacionales de la temperatura del agua **(A)** y la columna de agua **(B)** durante el primer **(1)** y el segundo período húmedo **(2)**. *Gráfico de Cajas y bigotes (Box & Whisker plot). El círculo central representa la mediana, el borde superior e inferior de la caja el primer y el tercer cuartil, respectivamente y los bigotes los valores extremos (mínimo y máximo).

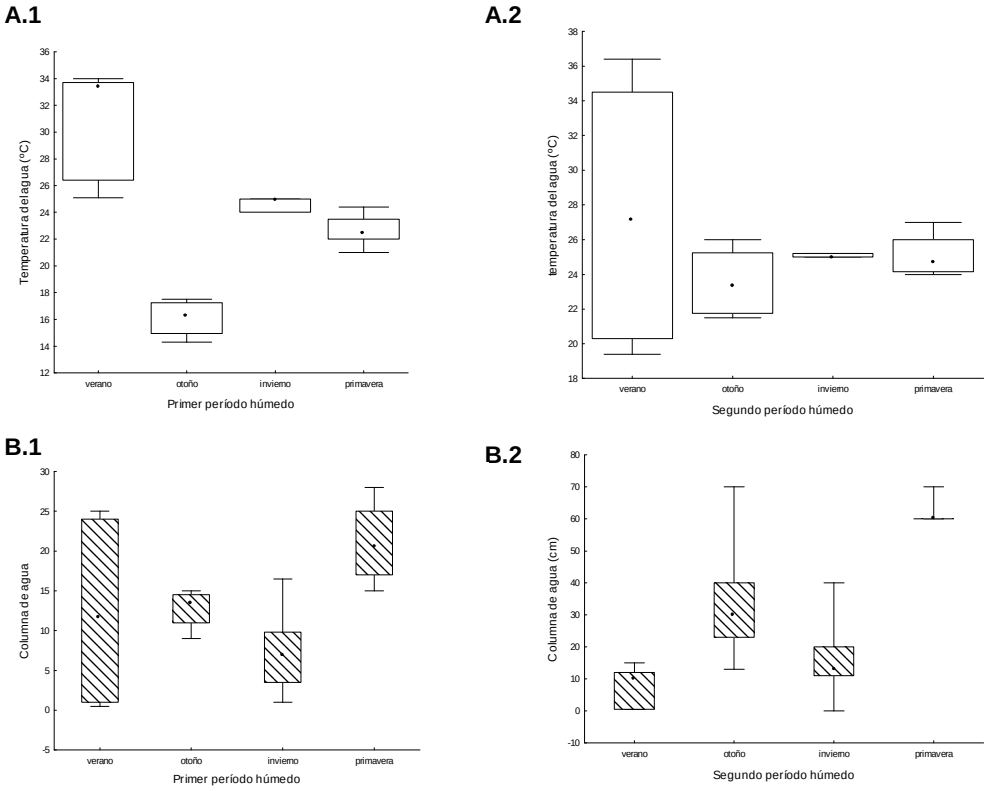


Figura 5.2: Canal ancho del Malezal. Variaciones estacionales de la temperatura del agua **(A)** y la columna de agua **(B)** durante el primer **(1)** y el segundo período húmedo **(2)***.

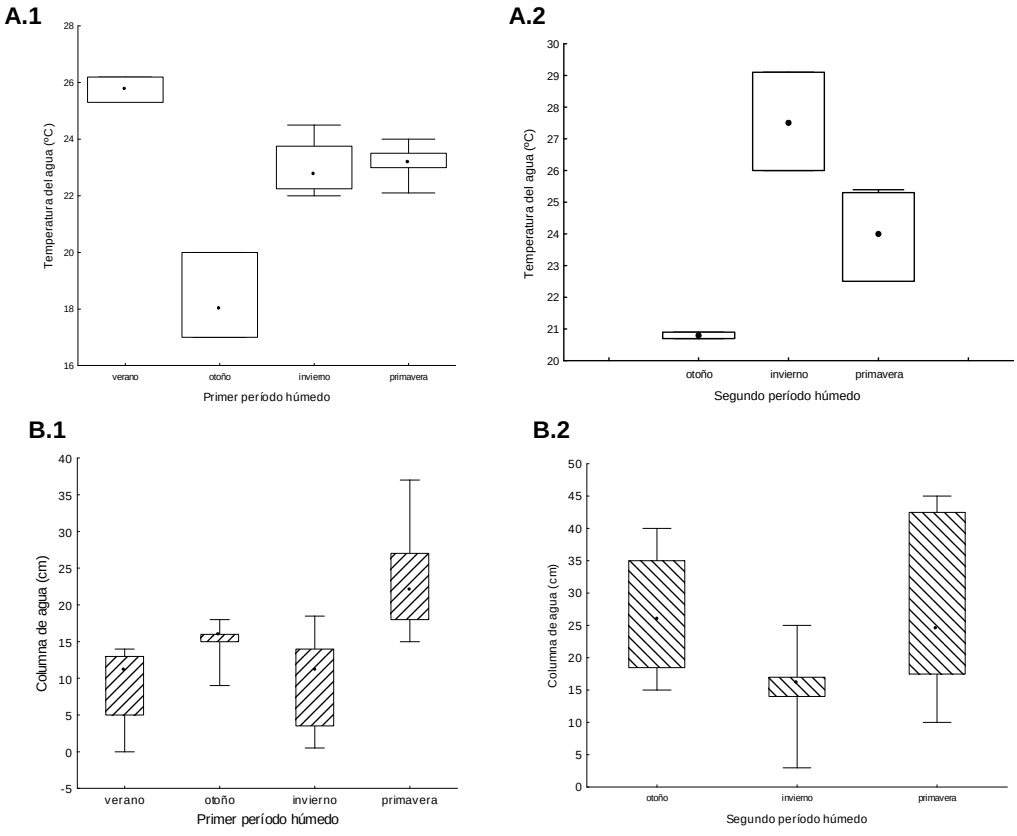
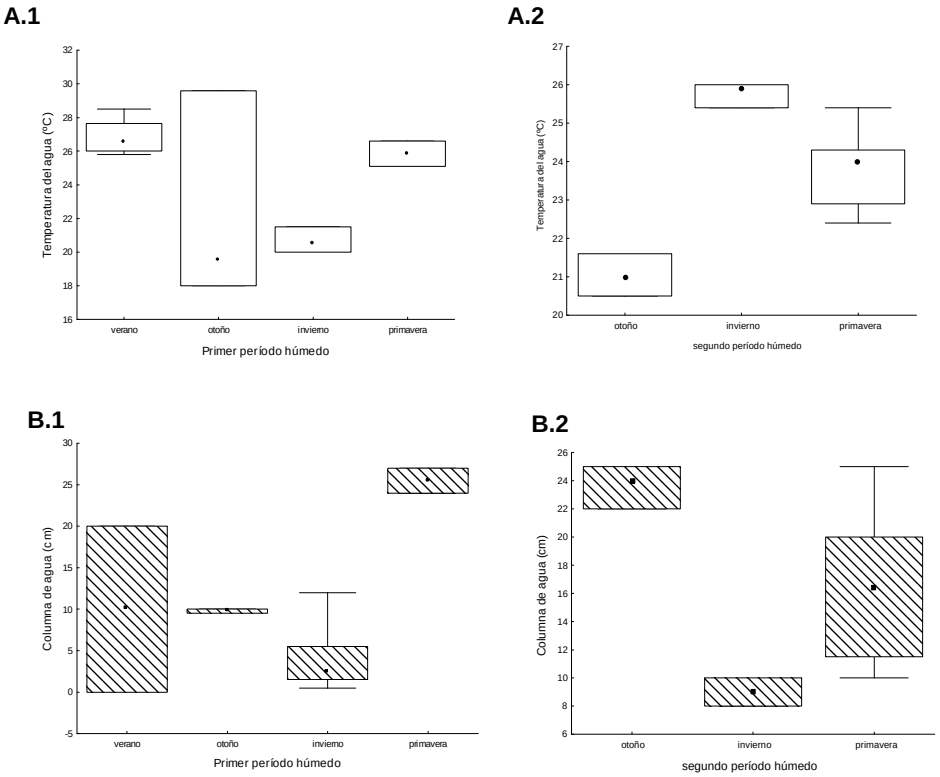


Figura 5.3: Canal angosto del Malezal. Variaciones estacionales de la temperatura del agua **(A)** y la columna de agua **(B)** durante el primer **(1)** y el segundo período húmedo **(2)***.



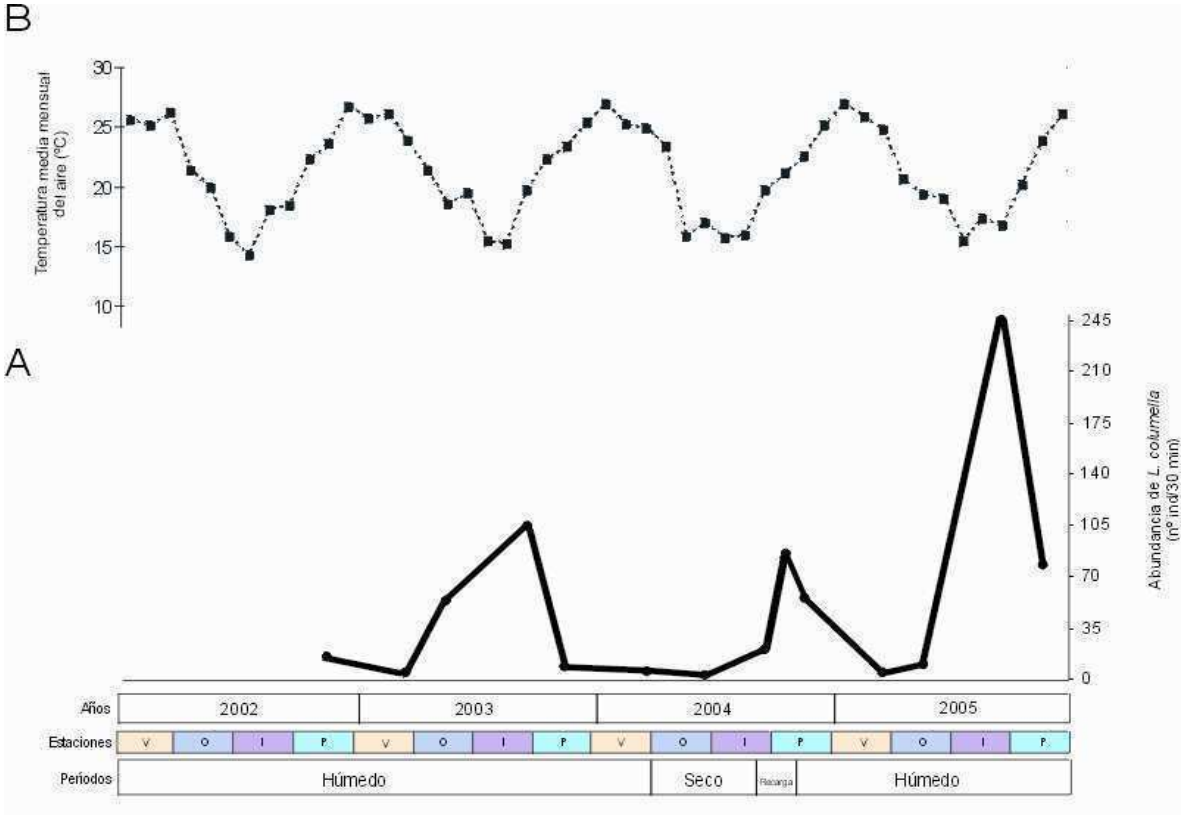
5.5.2. Abundancia

En el presente estudio se recolectaron en total 7.851 ejemplares de *Lymnaea columella*. Estos individuos fueron hallados a lo largo de todo el estudio, excepto en el muestreo de otoño de 2004 (período seco), cuando todos los ambientes estaban completamente secos (Tabla 5.1). En la Figura 5.4 se muestra el patrón estacional de la abundancia de *L. columella* (número de caracoles hallados en 30 minutos) a lo largo del tiempo. Durante los períodos húmedos la abundancia fue baja en verano, aumentó en otoño, alcanzó el pico máximo en invierno y descendió en primavera (Fig. 5.4). En el período de recarga la abundancia aumentó al aumentar las precipitaciones: se incrementó en invierno y el pico máximo se observó a principios de primavera (Fig. 5.4).

La abundancia de *L. columella* difirió significativamente **entre períodos** ($\chi^2_{(3)}$= 5.837,9, p< 0,001), registrándose la mayor abundancia en el 2ºPH (384,1 caracoles/30min; 58,7%), luego en el 1ºPH (170,9 caracoles/30min; 26,1%), en el período de recarga (99,3 caracoles/30min; 15,2%) y llego a 0 en el período seco. Las comparaciones de a pares mostraron diferencias significativas entre todas las combinaciones (p< 0,001).

En ambos períodos húmedos se observó una correlación negativa entre la abundancia de *L. columella* y la temperatura media (Fig. 5.4), máxima y mínima mensual del aire (1º PH: rs= -0,99, -0,94 y -0,83, respectivamente; 2º PH: rs= -0,90, -0,86 y -0,97, respectivamente; p< 0,05 en todos los casos). La abundancia de *L. columella* no estuvo correlacionada con la precipitación mensual (p> 0,05 para cada período).

Figura 5.4: Variación estacional de la abundancia de *Lymnaea columella* y de la temperatura media mensual del aire en Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina. **A.** Abundancia estacional de *L. columella*, **B.** Temperatura media mensual del aire. Ref.: Período húmedo: exceso de agua, período seco: escasas precipitaciones, período de recarga: aumento en las precipitaciones.



La abundancia de *L. columella* difirió significativamente **entre estaciones** tanto en el 1º PH ($\chi^2_{(3)}$= 153,8, p< 0,001) como en el 2º PH ($\chi^2_{(3)}$= 490,7, p< 0,001). Las comparaciones de a pares mostraron diferencias significativas entre todas las estaciones (p<0,001). En el 1º y en el 2º PH la mayor abundancia se registró en invierno (62,1% y 76,9%, respectivamente) y la menor en verano (0,9% y 0,2%, respectivamente) (p< 0,05 en ambos). Sin embargo, las abundancias registradas en otoño y en primavera mostraron patrones diferentes. En el 1º PH la abundancia en otoño (37,1%) fue significativamente mayor que en primavera (5,3%;

$\chi^2_{(1)}$= 30,1, p< 0,001), mientras que en el 2º PH la abundancia en primavera (21,0%) fue significativamente mayor que en otoño (1,9; $\chi^2_{(1)}$= 50,3, p< 0,001).

La abundancia de *L. columella* también mostró diferencias significativas **entre ambientes** en ambos períodos húmedos (1º PH: $\chi^2_{(2)}$= 32,6, p< 0,001 y 2º PH: $\chi^2_{(2)}$= 92,8, p< 0,001). En el 1º PH la abundancia fue similar en los canales anchos del Malezal y en el borde del Bañado (46,3 caracoles/30min; 54,1%, y 34,7 caracoles/30min; 40,6%, respectivamente; $\chi^2_{(1)}$=1,6, p= 0,19) y ambas resultaron significativamente mayores que la registrada en los canales angostos del Malezal (4,5 caracoles/30min; 5,3%; $\chi^2_{(1)}$= 68,5, p< 0,001). En cambio, en el 2º PH la abundancia en el borde del Bañado (121,7 caracoles/30min; 63,4%) fue significativamente mayor a la de los canales anchos del Malezal (56,9 caracoles/30min; 29,6%; $\chi^2_{(1)}$= 23,5, p< 0,001) y ambas resultaron significativamente mayores a la de los canales angostos del Malezal (13,4 caracoles/30min; 7,0%; $\chi^2_{(1)}$= 86,8 y $\chi^2_{(1)}$= 26,9, respectivamente; p< 0,001 en ambos casos).

En la Figura 5.5 A, B y C se muestra la abundancia, la temperatura y la columna media del agua para cada ambiente a lo largo de todo el período de estudio. Durante los períodos húmedos, la abundancia de *L. columella* no estuvo correlacionada con la temperatura del agua (p> 0,05), ni con el pH (p> 0,05) ni con la profundidad (p> 0,05), en ninguno de los ambientes (Fig. 5.5 A, B, C).

Cuando se analizó cada ambiente por separado considerando ambos períodos húmedos juntos, se encontraron diferencias significativas en la abundancia de *L. columella* entre estaciones en el borde del Bañado ($\chi^2_{(3)}$= 358,1, p< 0,001), en los canales anchos ($\chi^2_{(2)}$= 356,1, p< 0,001) y en los canales angostos del Malezal ($\chi^2_{(3)}$= 57,4, p< 0,001), como se muestra en la Tabla 5.2. Las comparaciones de a pares mostraron diferencias significativas entre todas las estaciones en los primeros dos ambientes, mientras que en los canales angostos del Malezal sólo la abundancia en primavera fue significativamente mayor a las demás (Tabla 5.2). En el borde del Bañado y en los canales anchos del Malezal la mayor y la menor abundancia se registró en invierno y en verano, respectivamente. En las otras estaciones estos ambientes exhibieron patrones opuestos, ya que *L. columella* fue más abundante en el borde del Bañado en primavera y en los canales anchos del Malezal en otoño.

Tabla 5.2: Abundancia estacional de *L. columella* en el borde del Bañado, en los canales anchos y en los angostos del Malezal, durante los dos períodos húmedos.

	Ambiente		
	borde del Bañado	Canal ancho del Malezal	Canal angosto del Malezal
Estación	A	A	A
verano	0,8%^{a}	0%^{a}	0,4%^{a}
otoño	10,6%^{b}	14,4%^{b}	3,9%^{a}
invierno	**68,9%^{c}**	**81,0%^{c}**	19,6%^{a}
primavera	19,7%^{d}	4,6%^{d}	**76,1%^{b}**

A: abundancia (número de individuo/30 min).

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05) entre estaciones dentro de cada ambiente.

Figura 5.5: Variaciones estacionales de la abundancia de *L. columella*, la columna de agua media y la temperatura media del agua en: **A)** los canales anchos del Malezal, **B)** el borde del Bañado y **C)** los canales angostos del Malezal.

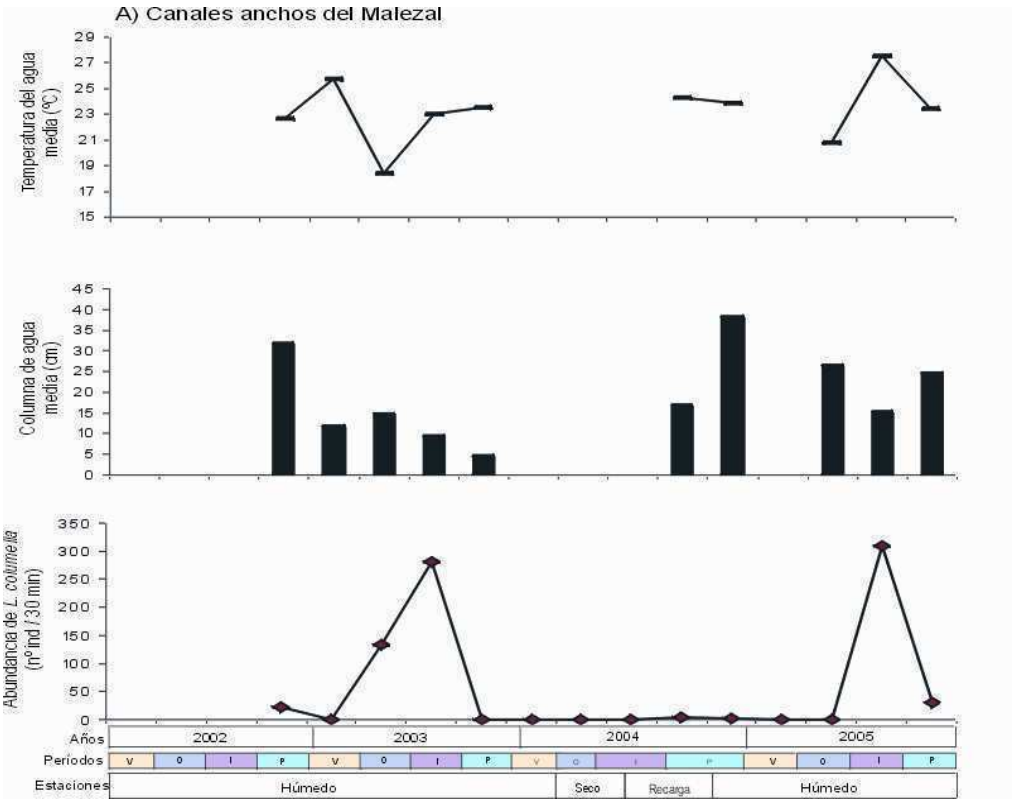
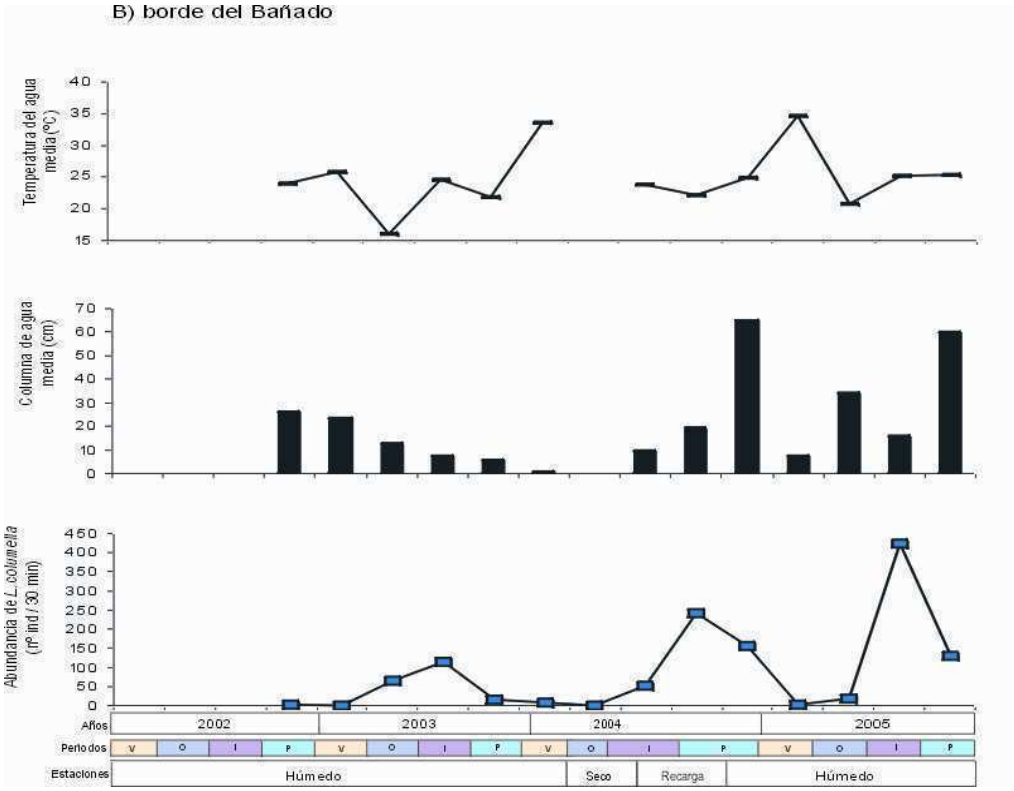
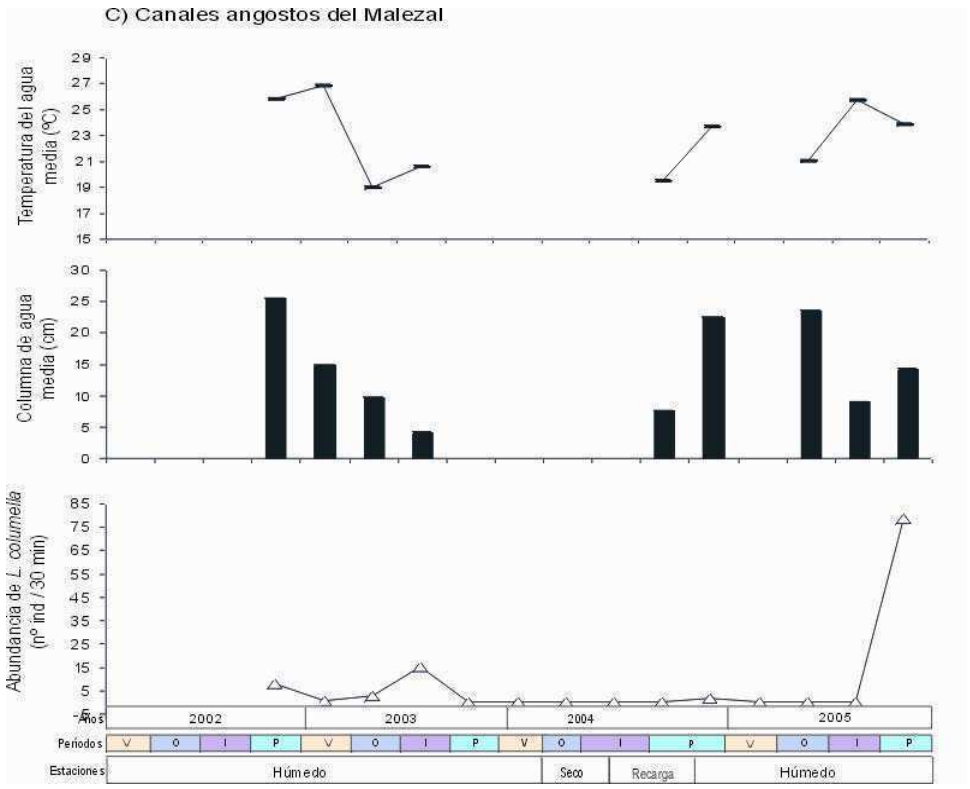


Figura 5.5 (cont): Variaciones estacionales de la abundancia de *L. columella*, la columna de agua media y la temperatura media del agua en: **A)** los canales anchos del Malezal, **B)** el borde del Bañado y **C)** los canales angostos del Malezal.





Durante el período seco los 3 ambientes se secaron completamente (Tabla 5.1, Fig. 5.5 A,B,C y Fig. 5.6 D,F,G) y como se mencionó anteriormente, no se encontraron caracoles.

En invierno del período de recarga el único ambiente con agua fue el borde del Bañado (Fig. 5.5 B) y allí se recolectaron 50 *L. columella*/30 min. A principios de primavera, cuando todos los ambientes contenían agua (Fig. 5.6 A-D, E), se recolectaron 243, 4 y cero *L. columella*/30 min en el borde del Bañado, en los canales anchos y en los canales angostos del Malezal, respectivamente (Fig. 5.5 A,B,C).

En el borde del Bañado y en los canales anchos del Malezal, aparte de *L. columella* se encontraron ejemplares del género *Biomphalaria*, *Physa* y *Drepanotrema* y de la familia Ampullariidae, mientras que en los canales angostos del Malezal sólo estaba presente *L. columella*. La abundancia de *L. columella* no mostró correlación con la abundancia de ninguno de los integrantes de la comunidad de gasterópodos ($p > 0,05$). Sin embargo, se observó una leve tendencia al aumento de la abundancia de *L. columella* al reducirse la del género *Biomphalaria* ($rs = -0,8$, $p = 0,2$) y al aumentar la de los demás grupos (*Drepanotrema*, *Physa* y Ampullariidae: $rs = 0,2$, $0,8$ y $0,4$, respectivamente, $p > 0,05$ para todas).

En la Tabla 5.3 se muestra la abundancia y la frecuencia relativa de cada integrante de la comunidad de gasterópodos por estación durante los períodos húmedos. En verano la comunidad de gasterópodos estuvo representada solamente por el género *Biomphalaria* y la especie *L. columella*, siendo la primera significativamente más abundante que la segunda ($\chi^2_{(1)} = 42,2$, $p < 0,001$) (Tabla 5.3). En el resto de las estaciones todos los grupos estuvieron presentes aunque con patrones de abundancias muy distintos. En otoño los grupos más representativos fueron *L. columella* y el género *Drepanotrema*, con abundancias similares entre sí ($p > 0,05$) y significativamente mayores al resto de los grupos ($\chi^2_{(3)} = 20,8$, $p < 0,001$) (Tabla 5.3). En invierno la abundancia de *L. columella* fue significativamente mayor a la de los demás grupos ($\chi^2_{(4)} = 887,9$, $p < 0,001$), constituyéndose en la especie más frecuente (98,7%; Tabla 5.3). En primavera las *L. columella* también fueron el grupo más abundante ($\chi^2_{(4)} = 68,3$, $p < 0,001$), seguido por las biomphalarias, las physas y las ampullariias con abundancias similares entre sí ($p > 0,05$) y mayores a la de las drepanotremas ($\chi^2_{(3)} = 26,7$, $p < 0,001$) (Tabla 5.3).

Tabla 5.3: Estructura de la comunidad de gasterópodos en Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina

	Períodos húmedos							
estación	verano		otoño		invierno		primavera	
Gasterópodos	A	F	A	F	A	F	A	F
Lymnaea columella	0,6	1,3%[a]	28,0	38,5%[a]	244,3	93,9%[a]	67,8	42,0%[a]
Biomphalaria spp	44,0	98,7%[b]	6,6	9,1%[b]	2,0	0,8%[b]	34,5	21,4%[b]
Drepanotrema spp	0,0	0,0%	27,0	37,1%[a]	2,0	0,8%[b]	3,5	2,2%[c]
Physa spp	0,0	0,0%	1,0	1,4%[c]	8,0	3,1%[b]	22,0	13,6%[b]
Ampullariidae	0,0	0,0%	10,1	13,9%[b]	4,0	1,5%[b]	33,5	20,8%[b]

A: Abundancia (nº individuos/ 30 min)

F: Frecuencia (% de caracoles de un grupo del total de gasterópodos recolectados)
Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05) entre la frecuencia de los gasterópodos por estación.

5.5.3. Aspectos biológicos de *L. columella*

En el borde del Bañado y en los canales anchos del Malezal frecuentemente se encontraron *L. columella* nadando activamente por la superficie del agua con el pie hacia arriba (Fig. 5.7 E), con el pie hacia abajo (Fig. 5.7 F), adheridas a tallos, hojas y raíces de plantas acuáticas (Fig. 5.7 A-C, G-I), en reposo sobre plantas flotantes o enraizadas (Fig. 5.7 F), o sobre el fondo (Fig. 5.7 D). Las *L. columella* presentaron actividad bajo temperaturas absolutas del agua entre 14,3ºC (otoño) y 36,4ºC (verano), pH entre 5 (otoño) y 7,8 (verano) y columnas de agua entre 0,5 cm (verano) y 70 cm (primavera) (Tabla 5.1). No se encontraron *L. columella* bajo columnas de agua mayores a 70 cm.

Cuando los ambientes se secaron, no se encontraron *L. columella* estivando ni conchillas vacías en las muestras de tierra analizadas.

Figura 5.6: Ambientes donde se encontraron *L. columella* en Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina, con y sin agua: **A** y **C**: Bañado con agua, **B**: Bañado con muy poca agua, **D**: Bañado seco, **E**: canal ancho del Malezal con agua, **F**: canal ancho del Malezal seco, **G**: canal angosto del Malezal seco.

A

B

C

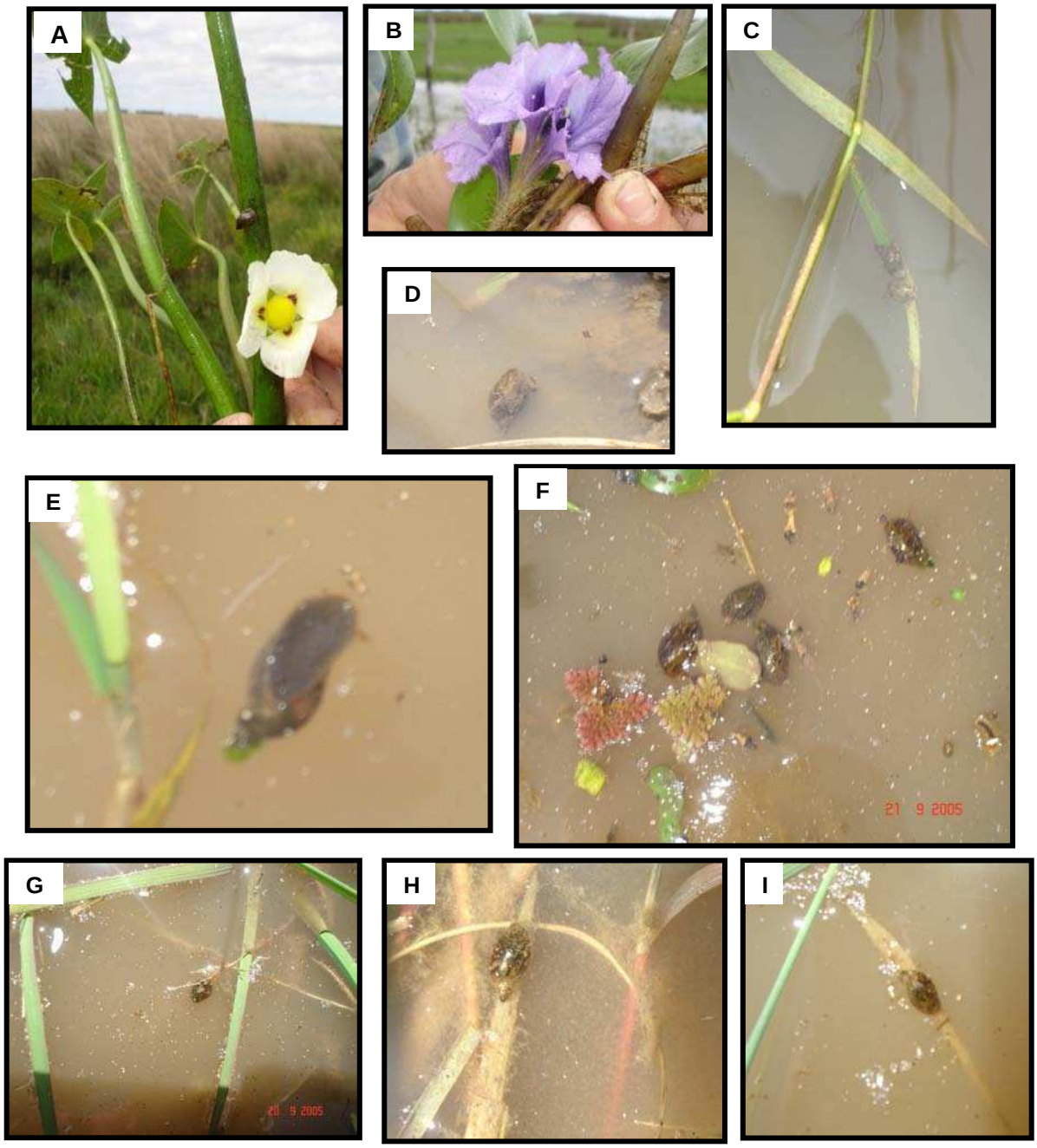
D

E

F

G

Figura 5.7: *Lymnaea columella* en su hábitat. **A** y **B**: Adherida a tallos de plantas acuáticas, **C**: Adherida a hojas vivas; **D:** sobre el barro en un ambiente poco profundo; **E**: nadando sobre la superficie del agua con el pie hacia arriba; **F:** nadando sobre la superficie del agua con el pie hacia abajo, **G**-**I**: Adherida a ramas y hojas muertas.



5.5.4. Estructura Poblacional

Los 7.851 ejemplares de *L. columella* midieron entre 1,1 y 25,3 mm de largo, con una mediana (M) de 7,1 mm y el primer y tercer cuartil de 4,6 y 10,9 mm, respectivamente.

La distribución de tamaños durante los dos períodos húmedos se muestra en la Figura 5.8. En el 1º PH se observaron diferencias significativas en el largo de la conchilla de *L. columella* entre estaciones ($H_{(3)}$= 196,6, p< 0,001). Las comparaciones de a pares mostraron diferencias significativas entre todas las estaciones (p< 0,001), encontrándose el mayor valor de la mediana en verano (M= 8,8 mm), luego en invierno (M= 7,6 mm), en otoño (M= 6,6 mm) y finalmente en primavera (M= 4,9 mm) (Fig. 5.8 A).

En el 2º PH también se observaron diferencias entre estaciones ($H_{(3)}$= 1691,4 p< 0,001), encontrándose los mayores valores de la mediana en verano e invierno (M= 9,8 y 11,9 mm, respectivamente, p< 0,05), los intermedios en primavera (M= 4,7 mm, p< 0,05) y los más bajos en otoño (M= 2,5 mm, p< 0,05) (Fig. 5.8 B).

En el período de recarga también se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los caracoles entre estaciones (U= 4189,5, p< 0,001), registrándose caracoles mas grandes en invierno (M=11,4 mm) que a principios de primavera (M= 4,6 mm), como se muestra en la Figura 5.9.

Figura 5.9: Tamaño de *L. columella* por estación en el período de recarga. Las franjas representan las distintas categorías de tamaños: A: recién nacidos (1-3,6 mm); B: juveniles (3,7-6,5 mm); C: medianos (6,6-13,1 mm), D: grandes (13,2-19,7 mm).
Gráfico de Cajas y bigotes (Box & Whisker plot). El círculo central representa la mediana, el borde inferior y superior de la caja el primer y el tercer cuartel, respectivamente y los bigotes los valores extremos (mínimo y máximo). Letras distintas indican diferencias significativas (p< 0,05) en el tamaño de *L. columella* entre estaciones.

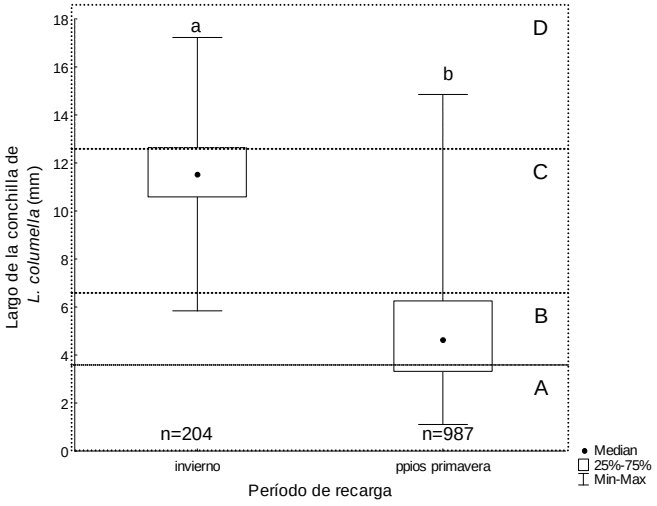
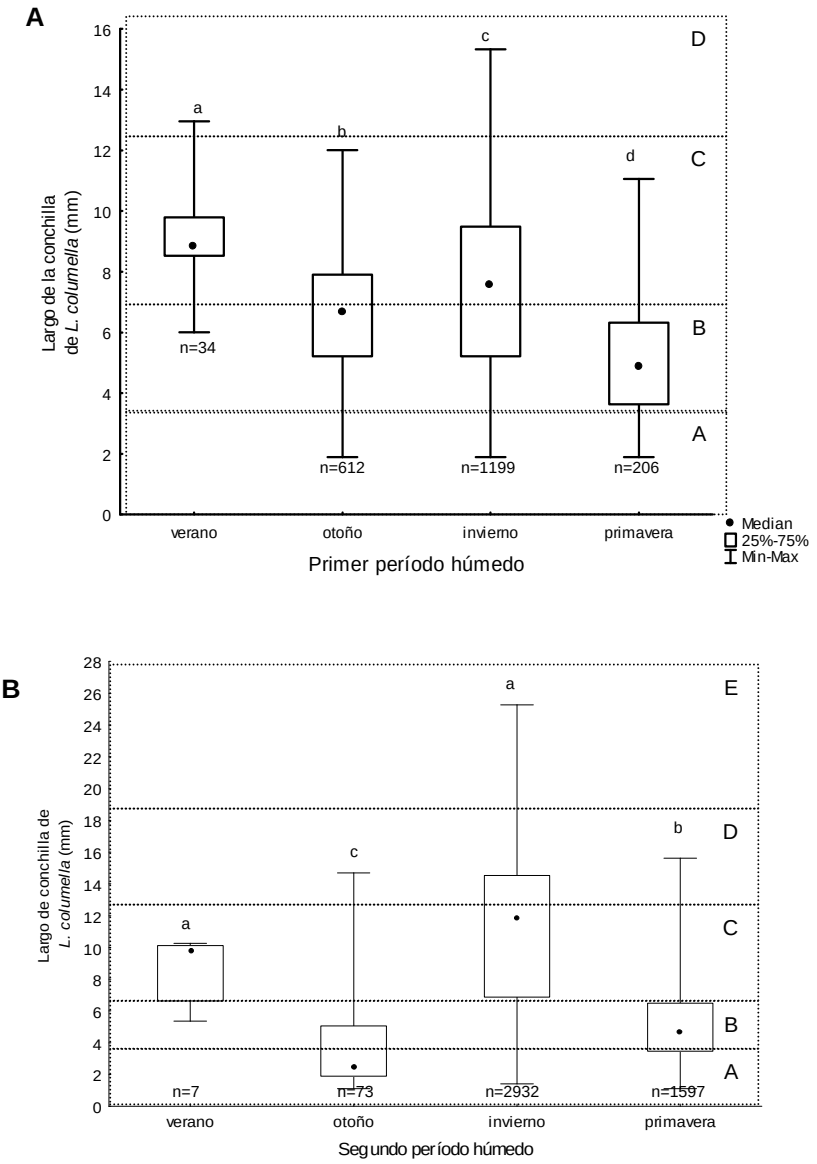


Figura 5.8: Tamaño de *L. columella* por estación en los períodos húmedos: **A)** primer período húmedo, **B)** segundo período húmedo. Las franjas representan las distintas categorías de tamaños: A: recién nacidos (1-3,6 mm); B: juveniles (3,7-6,5 mm); C: medianos (6,6-13,1 mm), D: grandes (13,2-19,7 mm); E: muy grandes (> 19,8 mm). El círculo central representa la mediana, el borde inferior y superior de la caja el primer y el tercer cuartel, respectivamente y los bigotes los valores extremos (mínimo y máximo). Letras distintas indican diferencias significativas (p< 0,05) en el tamaño de *L. columella* entre estaciones.



De acuerdo con Appleton (1974), las *L. columella* menores a 6,5 mm son consideradas inmaduras sexualmente. Además, en línea con el trabajo de Souza y Magalhães (2000), quienes encontraron que bajo condiciones experimentales *L. columella* eclosiona con 1,1 mm y alcanza una longitud media de 3,7 mm durante su primer mes de vida, las *L. columella* inmaduras (<6,5 mm) fueron subdivididas en dos categorías: **Recién nacidos** (individuos entre 1 y 3,6 mm) y **Juveniles** (individuos entre 3,7 y 6,5 mm). La presencia de caracoles

recién nacidos indica el reclutamiento de una nueva generación. A su vez, las *L. columella* adultas (> 6,5 mm) fueron asignadas a las siguientes categorías de tamaño: **Medianas** (6,6 – 13,1 mm), **Grandes** (13,2 – 19,7 mm) y **Muy grandes** (> 19,8 mm).
Considerando estas categorías de tamaño se puede observar en las Figuras 5.8 y 5.9 que en el 1º PH y en el de recarga se encontraron caracoles recién nacidos, juveniles, medianos y grandes y en el 2ºPH, aparecen también las *L. columella* muy grandes.

La estructura poblacional de *L. columella* durante el período de estudio se muestra en la Figura 5.10.

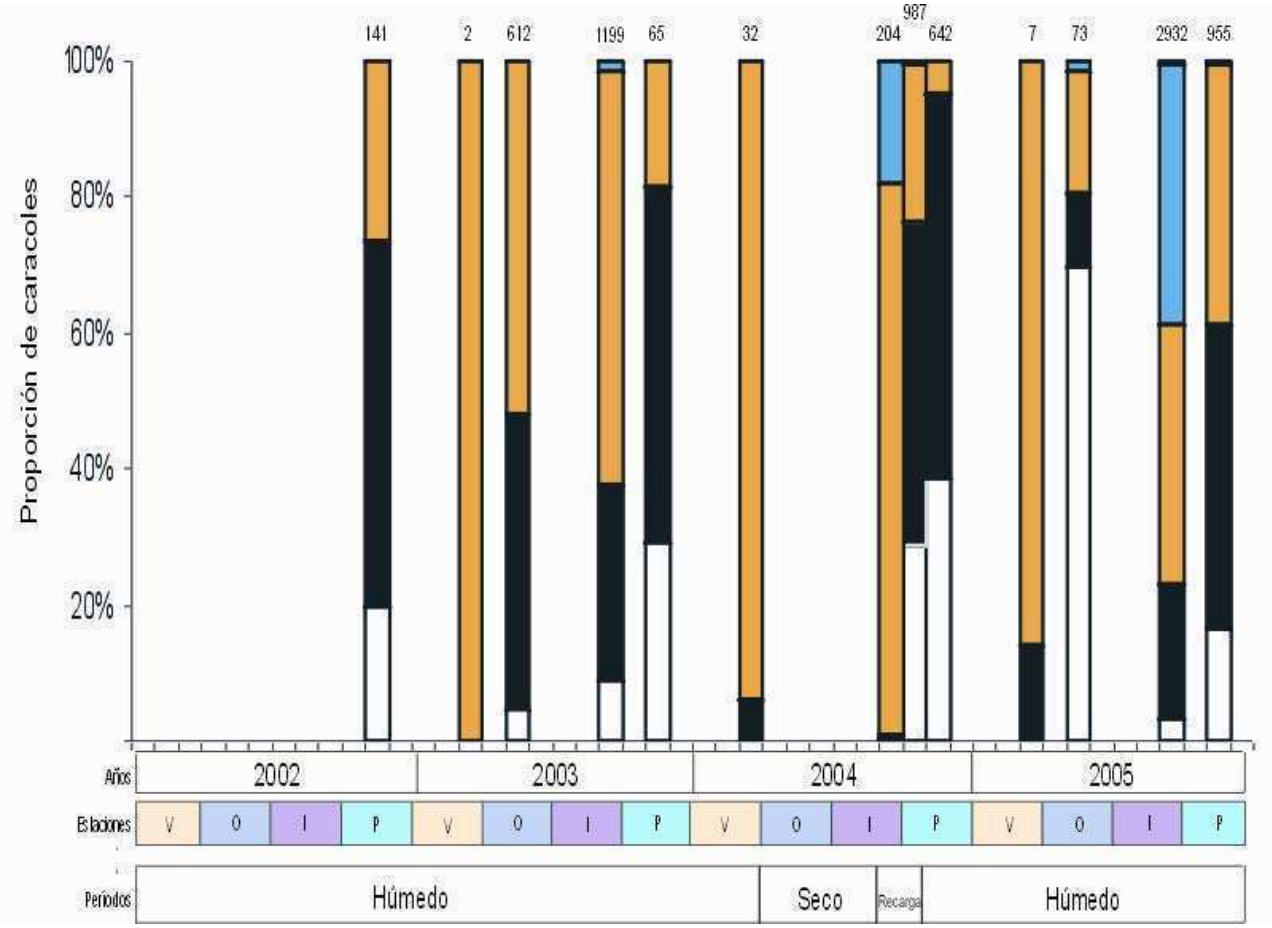
En los **veranos** del primer período húmedo (2003 y 2004) más del 90% de los caracoles eran medianos y los restantes, cuando estuvieron presentes, eran juveniles. En **otoño** la aparición de un 4,7% de caracoles recién nacidos y el aumento en la proporción de los juveniles (43,3%) indicó reclutamiento de nuevos individuos. En esta estación, la proporción de caracoles medianos disminuyó al 52%. En **invierno** aumentó la proporción de caracoles recién nacidos (9,2%), disminuyó la de juveniles (28,5%), se mantuvo constante la de medianos y por primera vez aparecieron caracoles grandes (2,9%). En las **primaveras** (2002 y 2003) se registró una proporción muy alta de caracoles inmaduros (73,8% y 82,2%, respectivamente) de los cuales alrededor del 20% eran recién nacidos. El resto de la población estaba compuesto por *L. columella* medianas (Fig. 5.10).

En el período de recarga la mayoría de los caracoles recolectados en **invierno**, inmediatamente después de que terminara la sequía, eran adultos (98,1%). De éstos, el 80,9% eran medianos y el resto grandes. A **principios de primavera** de 2004, la aparición de 29,0% y 47,2% de *L. columella* recién nacidas y juveniles, respectivamente, indicó el reclutamiento de nuevos individuos y la recuperación de la población.

En el segundo período húmedo la población de *L. columella* en el **verano** estaba constituida por un 85,7% de individuos medianos y los restantes eran juveniles mayores a 5,4 mm (Fig. 5.10). En **otoño**, la aparición de un 69,9% de caracoles recién nacidos y el aumento en la proporción de los juveniles (11,0%) indicó reclutamiento. Los caracoles medianos representaban el 17,6% de la población y los grandes el 2,7%. En **invierno** disminuyó la proporción de recién nacidos (3,2%), aumentó la de juveniles, medianos y grandes (19,8%, 38,1% y 38,5%, respectivamente) y por primera vez aparecieron caracoles muy grandes (0,3%). Finalmente, en las dos **primaveras** (2004 y 2005) se observó una gran proporción de caracoles inmaduros (95,3% y 61,3%, respectivamente), de los cuales el 38,5% y 16,3%, respectivamente eran recién nacidos. La proporción de caracoles adultos

difirió entre estas dos primaveras. En 2004 sólo se encontraron *L. columella* medianas (4,7%), mientras que en 2005 se encontró un 37,7% de medianos y un 0,6% de grandes (Fig. 5.10).

Figura 5.10: Estructura poblacional de *L. columella* de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina, durante el período de estudio. Referencias: Blanco: recién nacidos (1 – 3,6 mm); Negro: juveniles (3,7 – 6,5 mm); Naranja: medianos (3,6 – 13,1 mm); Celeste: grandes (13,2 – 19,7 mm). Los números sobre las barras indican la cantidad de *L. columella* medidas.



5.6. Discusión

De los resultados expuestos en este capítulo se desprende que *Lymnaea columella* se encuentra bien establecida y puede desarrollarse de manera óptima en dos de los humedales más distribuidos de la Provincia de Corrientes, los Bañados y los Malezales. Estos ambientes, como se mencionó en el capítulo 2, forman parte del Macrosistema del Iberá, uno de los humedales más importantes de Sudamérica por su extensión, su ubicación geográfica enmarcada en terrenos biogeográficos muy diferentes y su proximidad a grandes ríos (Neiff, 2003b). El Macrosistema del Iberá ocupa una superficie de 12.300 km^2 al NE de Argentina (Neiff, 2004) e integra a su vez un sistema más amplio de humedales conocido como la Región del Iberá que abarca unos 40.000 km^2 y constituye una de las principales fuentes de agua dulce no contaminada de Argentina, donde viven más de 4.000 especies vegetales y animales (Poi de Neiff, 2003).

Esta es la primera vez que se encuentra a un lymneido en un Bañado y un Malezal en Argentina. Hasta el presente trabajo las dos especies de *Lymnaea* más estudiadas en el país (*L. columella* y *L. viatrix)* habían sido encontradas en otro tipo de ambientes, por ejemplo, *L. columella* en lagos (Paraense, 1986), ríos (Castellanos y Landoni, 1981; Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2006; Paraense, 1986; Scott, 1953), diques (Paraense, 1986), charcos (Castellanos y Landoni, 1981), pantanos cubiertos de hierba (Paraense, 2005), canales de irrigación y campos de cultivo de arroz (Rumi y Hamann, 1990) y *L. viatrix* en arroyos, canales de irrigación (Castellanos y Landoni, 1981; Paraense, 2005), ríos (Castellanos y Landoni, 1981; Lombardero *et al.*, 1979a; Paraense, 2005), pantanos (Paraense, 2005), charcos (Castellanos y Landoni, 1981), mallines (Kleiman *et al.*, 2007) y lagunas (Castellanos y Landoni, 1981; Kleiman *et al.*, 2007).

Este resultado es importante porque amplia la diversidad de ambientes que puede habitar *L. columella* y porque contribuye al conocimiento de la riquísima fauna que vive en algunos de los humedales que integran el Macrosistema del Iberá.

El Bañado y el Malezal son humedales lénticos, o sea de aguas quietas, sin corriente (Neiff, 2003) y el hallazgo de *L. columella* en ambientes con estas características coincide con lo reportado por Castellanos y Landoni (1981) y Malek (1985). Desde la perspectiva de los caracoles y según la clasificación de Southwood (1977), a nivel espacial los humedales estudiados podrían considerarse *continuos*, ya que sus áreas favorables resultaron mayores a las que el caracol puede cubrir por dispersión. Esto significa que los caracoles podrían

desplazarse libremente siempre entre zonas favorables dentro de un mismo ambiente e incluso entre ambientes cuando éstos quedan interconectados en primavera.
A nivel temporal, los Bañados y los Malezales de la zona de estudio podrían clasificarse como *predecibles* (alternancia regular de períodos favorables y desfavorables; Southwood (1977)) ya que durante los períodos húmedos en otoño, invierno y primavera las condiciones fueron favorables y únicamente en verano las mismas se volvieron desfavorables para *L. columella*. Pero, podrían clasificarse como *impredecibles* (períodos favorables de variada duración, interrumpidos por períodos desfavorables también de variada duración; Southwood (1977)), si se considera el período seco, ya que la sequía interrumpió repentinamente las condiciones favorables.

5.6.1. Abundancia

La ausencia de caracoles durante el período seco y la menor abundancia de *L. columella* en el período de recarga, respecto de ambos períodos húmedos, estaría reflejando el efecto negativo de la sequía sobre la población de caracoles. Una respuesta similar ante una sequía fue observada para *L. columella* en Brasil (Amato *et al.*, 1986) y para *L. bulimoides* en USA (Malone *et al.*, 1984). En los períodos húmedos, la lluvia no parece ser un factor limitante para la población de *L. columella* ya que la falta de correlación entre la abundancia y la precipitación sugiere que los ambientes estudiados contenían la mínima cantidad de agua necesaria para permitir el desarrollo de la población durante todo el año.

En el segundo período húmedo la abundancia de *L. columella* fue significativamente mayor a la del primer período húmedo, a pesar de que se muestrearon los mismos ambientes y en las mismas estaciones, y de que no se observaron grandes diferencias en las variables climáticas (Fig. 3.2) y ambientales (Tabla 5.1). Esta diferencia de abundancias podría estar relacionada con la infección por trematodes, que puede alterar ciertos parámetros de sus hospedadores intermediarios (Lafferty, 1993) como su tasa de reproducción y de supervivencia (Sorensen y Minchella, 2001). Entonces, la menor abundancia de *L. columella* en el primer período húmedo podría deberse a una mayor prevalencia de infección, por ejemplo, por *Fasciola hepatica*. Esto se analizará en el próximo capítulo (# 6), referente a la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en la zona de estudio.

El patrón estacional de la abundancia de *L. columella* en Berón de Astrada fue similar en ambos períodos húmedos (Fig. 5.4), con los valores más bajos registrados en verano, los más altos en invierno y los intermedios en primavera y otoño.

En **verano**, las altas temperaturas del aire (Fig. 5.4) y la falta de agua (los canales anchos y angostos del Malezal estuvieron secos en 2 de los 3 veranos; ver Tabla 5.1) o la reducción de la columna de agua (como ocurrió en el borde del Bañado en 2 de los 3 veranos; ver Tabla 5.1), pudieron haber limitado el desarrollo y la supervivencia de *L. columella*, reduciendo su abundancia. Resulta llamativo que la mayor abundancia de *L. columella* se halla encontrado en **invierno**, cuando se registraron temperaturas medias estacionales del aire (16,6ºC) cercanas al límite inferior del rango de temperaturas en el cual se desarrollan los lymneidos (10-30ºC).

En **otoño** la menor abundancia de *L. columella* con respecto al invierno podría deberse a un arrastre de la situación de los veranos secos y calurosos, en el sentido de que no transcurrió el tiempo suficiente para que la población se recupere completamente. En **primavera**, la disminución de la abundancia respecto al invierno podría deberse al aumento en el nivel de agua registrado en todos los ambientes (Figura 5.1, 5.2 y 5.3; Tabla 5.1) como consecuencia de un aumento en las precipitaciones que generó exceso de agua en el suelo (Fig. 3.2). Esta situación podría haber provocado la dispersión de las *L. columella* hacia otros sitios más lejanos, no incluidos en los muestreos, diluyendo consecuentemente su abundancia en los ambientes muestreados, lo cual se vió reflejado en una disminución de la abundancia. La disminución de la abundancia de *L. columella* y otros moluscos como consecuencia de un aumento en las precipitaciones fue observado por otros autores (Barbosa y Barbosa, 1994; Coelho y Lima, 2003).

Además de las variables climáticas y ambientales recién analizadas, el patrón de abundancias de *L. columella* podría estar relacionado con la presencia y la abundancia de los otros caracoles que habitan los humedales e integran la comunidad de gasterópodos, como las ampullarias, las physas, las drepanotremas y las biomphalarias (Tabla 5.3). De éstos, sólo el último grupo parece tener una relación definida con la especie en estudio, ya que su abundancia estacional fue inversa a la de *L. columella*, lo cual podría sugerir una interacción negativa entre ambos grupos, como la competencia por los recursos. De acuerdo con Dillon (2000), los lymneidos y la Familia Planorbidae, que incluye al género *Biomphalaria*, pueden competir por alimento ya que son consumidores generalistas y sus dietas suelen superponerse. De hecho, Utzinger y Tanner (2000) encuentran que *Lymnaea natalensis* y *Biomphalaria pfeifferi* podrían competir por los recursos porque prefieren el mismo tipo de sustrato. Por lo tanto, en **verano** la gran abundancia del género *Biomphalaria* podría explicar la disminución de la abundancia de *L. columella* y, en forma análoga, la casi desaparición de las biompahalarias en **invierno**, permitiría el boom poblacional de *L.*

columella (Fig. 5.4). Los otros grupos no parecen influir en la abundancia de *L. columella* (Tabla 5.3). La coexistencia entre *L. columella* y caracoles de los géneros Physas, Drepanotrema y Ampullaria fue reportada numerosas veces (Coelho, 2007; Teles *et al.*, 1991).

El patrón estacional de abundancias de *L. columella* observado en este trabajo es similar al reportado en los pocos estudios realizados sobre aspectos ecológicos de esta especie. En Puerto Rico (León-Dancel, 1970) y en Brasil (Amato *et al.*, 1986; Mattos *et al.*, 1997) las abundancias fueron máximas en los meses más fríos y mínimas en los más calurosos. Esta relación inversa entre la abundancia y la temperatura también fue observada en *Lymnaea bulimoides* en Louisiana, USA (Malone *et al.*, 1984).

El hecho de que los canales anchos del Malezal y el borde del Bañado presentaran abundancias altas y similares en el primer período húmedo (40,6 y 54,1%, respectivamente) permite afirmar que son los ambientes más favorables para el desarrollo de *L. columella* en la zona de estudio. Además, el **borde del Bañado** fue el ambiente con mayor abundancia en el segundo período húmedo (63,4%) y el único donde se encontraron caracoles en el período de recarga. Este ambiente fue el único con agua durante los veranos y antes e inmediatamente después de la sequía (Tabla 5.1 y Fig. 5.5 B). Esto podría deberse a que el Bañado: 1) se encuentra en las zonas más bajas del terreno y recibe el excedente de agua de las zonas altas, 2) posee una leve concavidad que le permite retener el agua acumulada por más tiempo y 3) posee numerosas plantas acuáticas que mantienen la humedad del suelo. Esto lo convertiría en un ambiente muy importante para la dinámica poblacional de *L. columella*, ya que actuaría como el lugar de estivación de los caracoles durante las épocas desfavorables (sequías) y como fuente de los mismos cuando mejoran las condiciones. De hecho fue allí donde se encontraron los últimos ejemplares de *L. columella* en el verano (2004) del 1º PH previo a la sequía de 6 meses. Si bien no se encontraron caracoles enterrados durante el período seco, la capacidad de *L. columella* de estivar y resistir condiciones de sequía y calor ha sido reportada tanto en condiciones naturales (Amato *et al.*, 1986) como experimentales (Harris y Charleston, 1977b).

Las *L. columella* aparecieron en el Bañado en invierno del período de recarga, posiblemente porque aumentaron las precipitaciones y el ambiente comenzó a retener agua. Desde allí seguramente los caracoles se desplazaron hacia los otros ambientes a medida que éstos aumentaban su columna de agua, con lo cual el Bañado actuaría como fuente de *L. columella*. En los canales anchos del Malezal se observaron nuevamente caracoles a

principios de primavera (2004) del período de recarga (Fig. 5.5 A), mientras que en los canales angostos se observaron recién en la primer primavera del 2º PH (Fig. 5.5 C).
El hallazgo de ejemplares de *L. columella* nadando por la superficie del agua con el pie hacia arriba (Fig. 5.7 E) permite suponer que estos caracoles pueden trasladarse activa y libremente entre ambientes. Este comportamiento, denominado nado de espaldas o "back-swimming", constituye el mecanismo principal de desplazamiento en *Lymnaea stagnalis* y se ve facilitado por la existencia de una membrana hidrofóbica, secretada por el pie del caracol, que se adhiere a la superficie del agua y lo sostiene (Aono *et al.*, 2008).

Por otro lado, resulta llamativa la gran cantidad de caracoles hallados en los **canales anchos del Malezal** (54,1% y 29,6% del total recolectado en el primer y segundo período húmedo, respectivamente) teniendo en cuenta que este ambiente estuvo seco en 4 muestreos (Tabla 5.1) y no se encontraron caracoles en otros 2 muestreos, aun en presencia de agua (Fig. 5.5 A). Estas sequías no parecen afectar a los caracoles, que alcanzan abundancias altas y semejantes a las observadas en un ambiente más permanente como fue el Bañado. Seguramente esto se deba a que durante los períodos en que los canales anchos del Malezal tienen agua, los caracoles encuentran recursos suficientes para incrementar notablemente su abundancia y compensan los efectos negativos de las sequías.
Esta observación se ve reforzada por la abundancia registrada en los **canales angostos del Malezal** que a pesar de haber estado seco en los mismos momentos que los canales anchos, presentaron abundancias significativamente menores. Esto podría deberse a las siguientes características no favorables de este último ambiente: la falta de vegetación acuática, la presencia continua de sombra que impediría el desarrollo y el crecimiento de algas y columnas de aguas poco profundas.
Por todo lo expuesto se podría pensar que son las características ambientales de los distintos humedales, y no la frecuencia y cantidad de las sequías, las que modulan el patrón de abundancias de *L. columella*, ya que esta posee diversas estrategias que le permiten sobrevivir a los períodos desfavorables y recuperarse rápidamente, si el ambiente le brinda las condiciones y recursos adecuados.

5.6.2. Estructura poblacional

La distribución de tamaños de *L. columella* mostró un patrón similar en ambos períodos húmedos. En verano predominaron los caracoles medianos, en otoño los medianos,

juveniles y recién nacidos, en invierno estuvieron presentes todas clases de tamaño y en primavera, al igual que en otoño, hubo presencia de caracoles medianos, juveniles y recién nacidos (Fig. 5.8 A-B).

En otoño, invierno y primavera del 2ºPH el tamaño de los caracoles fue mayor que en el 1ºPH, a pesar de que no se observaron grandes diferencias en las variables climáticas (Fig. 3.2). Esta diferencia podría deberse a la infección por trematodes, que puede disminuir la tasa de crecimiento, de reproducción y de supervivencia de los hospedadores intermediarios (Gutiérrez *et al.*, 2002a; Sorensen y Minchella, 1998). La relación entre el tamaño de *L. columella* y su prevalencia de infección por *F. hepatica* se analizará en el próximo capítulo (# 6), referente a la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en la zona de estudio.

Durante los períodos húmedos *L. columella* mostró un patrón de reproducción continua entre otoño y primavera, evidenciado por la presencia constante de individuos recién nacidos (entre 1 y 3,6 mm; Fig. 5.10). En **verano**, la falta de reclutamiento y la presencia casi exclusiva de individuos medianos (Fig. 5.10) estaría reflejando el impacto negativo de las altas temperaturas y la falta de agua sobre la población en estudio. En **primavera** y en **otoño** la población alcanzó su máximo potencial reproductivo, evidenciado por la gran proporción de caracoles recién nacidos y juveniles (48 - 95,3%; Fig. 5.10). Esto podría deberse a dos estrategias distintas: en primavera cuanto mayor sea el número de descendientes, mayor será el número de sobrevivientes en verano cuando las condiciones ya no son favorables, mientras que en otoño una mayor cantidad de caracoles recién nacidos podría aprovechar la creciente disponibilidad de recursos. En **invierno**, todas las categorías de tamaños estuvieron presentes y se encontraron los caracoles más grandes. De hecho, en el invierno del 2ºPH se encontró el caracol más grande reportado alguna vez para esta especie, con un largo de conchilla de 25,3 mm. Hasta esta tesis, los ejemplares más grandes de *L. columella* provenientes del campo medían 20 mm (Mattos *et al.*, 1997) y aquellos criados bajo condiciones experimentales, 21,5 mm (Souza y Magalhães, 2000).

En cuanto a la abundancia y la estructura poblacional, se observó que la recuperación de la población luego de la drástica disminución del verano comenzó en otoño, como lo indicó la aparición de una gran cantidad de individuos inmaduros (Fig. 5.10), los cuales podrían alcanzar la madurez sexual en invierno, cuando los caracoles maduros representaron más del 60% de la población (Fig. 5.10) y se alcanzó el pico máximo de abundancia (Fig. 5.4). Más aún, los huevos puestos por la gran cantidad de adultos en invierno probablemente eclosionaron y se desarrollaron en primavera, contribuyendo a la gran proporción de caracoles inmaduros registrados en esta estación (Fig. 5.10). En verano,

la presencia casi exclusiva de caracoles maduros sugiere que éstos invirtieron más en su crecimiento corporal que en reproducirse, seguramente como estrategia para asegurar su supervivencia ante las condiciones ambientales adversas. Malone *et al.* (1984), quién estudió la dinámica de una población de *L. bulimoides* en una región de Estados Unidos con veranos calurosos y secos, encontró que el mayor esfuerzo reproductivo se daba en la primavera y que en verano se observaba una sustancial disminución de la población, asociada al déficit de agua, al igual que en la población de *L. columella*.

Como se mencionó anteriormente, Souza y Magalhães (2000) informaron que *L. columella* mide en promedio 1,1 mm al eclosionar y crece 2,6 mm más hacia el final de su primer mes de vida. Suponiendo que los individuos de la población estudiada crecieron a esta tasa en forma constante, la primera madurez sexual (6,5 mm) la alcanzarían a los 3 meses de vida. Los estudios experimentales han mostrado que *L. columella* puede alcanzar la madurez sexual en 2 meses (Krull 1933, citado en Gomes *et al*. (1975). Teniendo en cuenta estos números, se puede suponer que en Berón de Astrada, los caracoles recién nacidos recolectados en otoño, invierno y primavera seguramente provinieron de caracoles que alcanzaron la madurez sexual durante la estación anterior (3 meses) o en menor medida, en la misma estación (2 meses). La ausencia de caracoles recién nacidos en verano puede deberse a una pausa en la puesta de huevos por parte de los adultos de primavera o incluso de verano, reanudándose la producción de crías en otoño, cuando aparece nuevamente una gran proporción de *L. coumella* inmaduras. En otras especies de lymneidos también se observó la interrupción de su reproducción durante la estación desfavorable (Boray, 1969; Kleiman *et al.*, 2007; Malone *et al.*, 1984). En base a estos resultados, en la zona de estudio *L. columella* podría producir al menos 3 generaciones por año, todas superpuestas.

Resulta difícil comparar los datos sobre la estructura y la dinámica poblacional de *L. columella* generados en esta tesis con aquellos reportados para esta especie en otras regiones. La información disponible es escasa y fragmentada porque el tamaño de los caracoles es promediado por muestreos, o porque los caracoles son clasificados en pequeños o juveniles sin poderse identificar a los recién nacidos, o porque son clasificados en grandes o adultos sin mencionar el tamaño al cual alcanzan la madurez sexual. En Brasil hay poblaciones de *L. columella* que presentan un único evento reproductivo al año pero cuya duración oscila entre 2 meses (desde fin de la primavera hasta principios del verano) (Coelho y Lima, 2003) y 10 meses (verano, otoño y fin del invierno) (Mattos *et al.*, 1997). Dos eventos reproductivos fueron observados también en Brasil, uno en verano y el otro entre fin del invierno y principio de primavera (Amato *et al.*, 1986) y en Estados Unidos uno

en verano y el otro en otoño (Jokinen, 1985). Además, se encuentran resultados dispares respecto al número de generaciones por año que puede producir *L. columella*. Mattos *et al.* (1997) reporta sólo una generación, mientras que Amato *et al.* (1986) observa dos generaciones anuales.

En relación a la procedencia de los caracoles luego de la sequía, si bien no se encontraron *L. columella* sobre o debajo de la tierra durante el período seco, el haber encontrado individuos inmediatamente después de la sequía, cuando los ambientes comenzaron a llenarse con el agua de lluvia (invierno del período de recarga), permite suponer que los caracoles estaban enterrados estivando y no que inmigraron desde otras zonas. La habilidad de esta población para sobrevivir largos períodos de sequía podría basarse en una adaptación a los veranos secos y calurosos. Las *L. columella* medianas parecen ser las más resistentes a las condiciones ambientales desfavorables porque predominaron antes y después de la sequía (V2004 del 1ºPH y I del período de recarga, respectivamente) y en los veranos. Resultados similares fueron obtenidos por Malone *et al*. (1984), quienes encuentran que las *L. bulimoides* medianas fueron las que predominaron tanto entre las que estaban estivando como entre las que emergieron de la estivación. Una mayor tolerancia a la desecación a medida que aumenta el tamaño de los caracoles fue observada también bajo condiciones experimentales en una población de *L. columella* de Nueva Zelanda (Harris y Charleston, 1977b). Sin embargo, según Jokinen (1978) el tamaño de los lymneidos con mayor capacidad para sobrevivir a períodos de sequía es especie específico, ya que por ejemplo los juveniles de *L. elodes* y de *L. peregra* son los que estivan y en *L. truncatula* todos los tamaños, incluso los huevos, son capaces de estivar (Jokinen, 1978).

Gérard (2001) plantea que luego de una sequía, el tiempo que transcurre hasta que reaparecen los caracoles en el ambiente y se recuperan sus poblaciones depende de la época del año en que tuvo lugar la sequía. En la población estudiada se encontraron *L. columella* que habían estivado inmediatamente después de la sequía, mientras que, por ejemplo, en San Pablo, Brasil, las *L. columella* fueron encontradas un mes después de finalizada la misma (Amato *et al.*, 1986). Más aún, en Berón de Astrada la recuperación de la población sólo tardó un mes, como lo indicó el hecho de que la abundancia inmediatamente después de la sequía fue comparable a la mayor abundancia del primer período húmedo (82,3 caracoles/30 min a principios de primavera del período de recarga vs. 99,9 caracoles/30 min en invierno del 1ºPH; Fig. 5.4). En cambio, a la población de *L. columella* de Brasil le llevó tres meses recuperarse completamente de la sequía (Amato *et*

al., 1986). Estas diferencias podrían deberse a la época del año en que tuvieron lugar las sequías en cada lugar, ya que la duración de las mismas fue similar (6 meses). En Berón de Astrada la recuperación seguramente fue más rápida porque ocurrió bajo las temperaturas leves de la primavera y en Brasil ocurrió bajo el caluroso verano (Amato *et al.*, 1986).

En esta tesis *L. columella* fue encontrada en ambientes con pH entre 5 y 7,8, los cuales están dentro de los limites de tolerancia reportados para la familia Lymnaeidae (Malone y Yilma, 1999; Van Someren, 1946).

El desarrollo de los lymneidos suele ocurrir entre los 10 y 30ºC (Claxton *et al.*, 1999; Torgerson y Claxton, 1999). Sin embargo, Harris y Charleston (1977a) reportaron que los huevos de *L. columella* se mantienen viable a temperaturas de hasta 36℃. En esta tesis se observó que *L. columella* estuvo activa durante todo el año y a temperaturas del agua que oscilaron entre 14,3 y 36,4ºC. Una gran tolerancia a las altas temperaturas también fue reportada para esta especie en otras regiones (Boray, 1981; Harris y Charleston, 1977a; Malone, 1994). Como se comentó en el capítulo 4, en algunas regiones esta mayor tolerancia de *L. columella* a un amplio rango de temperaturas puede eventualmente llevar al reemplazo de las especies nativas de lymneidos (DeKock *et al.*, 1989).

En Berón de Astrada, *L. columella* fue encontrada siempre sumergida en el agua, ya sea en el fondo o adherida a la vegetación, independientemente a la altura de la columna de agua que osciló entre 0,5 y 70 cm. El comportamiento predominantemente acuático de *L. columella* fue descripto previamente por Malek (1985).

En conclusión, la población de *L. columella* estudiada fue encontrada en hábitas típicos del Macrosistema del Iberá, uno de los humedales de agua dulce más grandes de Sudamérica (Ferrati *et al.*, 2005), lo cual sugiere que podría estar ampliamente distribuida en esta Región. Mas aún, los resultados expuestos en este capítulo muestran que *L. columella* se encuentra muy bien establecida en el área de estudio, en base a que se observó la coexistencia de individuos inmaduros y maduros durante casi todo el período de estudio, excepto en verano. En esta estación, el hallazgo de ejemplares adultos capaces producir una descendencia viable en cuanto las condiciones se volvieron favorables, estaría reflejando la adaptación de esta especie a las condiciones ambientales. De hecho, la población de *L. columella* pudo recuperarse de la sequía y alcanzar rápidamente valores de abundancias semejantes a los observados antes del período seco.

Por último, esta población de *L. columella* reuniría las condiciones requeridas para ser hospedador intermediario de *Fasciola hepatica*. Su presencia casi permanente y su

ininterrumpida actividad, su gran abundancia y sus hábitos acuáticos podrían aumentar la probabilidad de encuentro con el parásito.

El rol que cumple *Lymnaea columella* en la transmisión de *F. hepatica* se analiza a continuación en el capítulo 6.

5.7. **Conclusiones**

5.7.2. *Lymnaea columella* se desarrolla exitosamente en Bañados y Malezales, dos ambientes típicos del Macrosistema del Iberá, uno de los humedales de agua dulce más grandes de Sudamérica,

5.7.3. Este hallazgo constituye el primer registro en Argentina de una especie de lymneido en este tipo de humedales,

5.7.4. *L. columella* fue encontrada siempre sumergida y bajo columnas de agua de entre 0,5 y 70 cm, confirmando su comportamiento predominantemente acuático,

5.7.5. Fue hallada en ambientes con pH entre 5 y 7,8 y temperaturas del agua entre 14,3℃ y 36,4℃, confirmando su gran tolerancia a u n amplio rango de condiciones ambientales,

5.7.6. Fue hallado el ejemplar más grande reportado alguna vez para *L. columella*, con un largo de conchilla de 25,3 mm.

5.7.7. Se encontraron ejemplares a lo largo de todo el estudio, con la excepción del período seco, cuando todos los ambientes estaban completamente secos,

Durante los períodos húmedos:

5.7.8. Se encontraron ejemplares de *L. columella* en todas las estaciones y ambientes,

5.7.9. La abundancia de *L. columella* fue mayor en el borde del Bañado y en los canales anchos del Malezal,

5.7.10. A nivel estacional, la abundancia de *L. columella* fue baja en verano, aumentó en otoño, alcanzó el pico máximo en invierno y descendió en primavera,

5.7.11. En **verano** las altas temperaturas del aire y la falta o la reducción de la columna de agua pudieron haber limitado el desarrollo y la supervivencia de *L. columella*. El boom poblacional del **invierno** podría estar asociado a la desaparición de las Biomphalarias. En **primavera**, la disminución de la abundancia respecto del invierno podría deberse a la dispersión de las *L. columella* hacia otros sitios producto del aumento en el nivel de agua registrado en todos los ambientes,

5.7.12. La precipitación no parece ser un factor limitante para la población de *L. columella* ya que los ambientes contendrían la mínima cantidad de agua necesaria para el desarrollo de la población durante todo el año,

5.7.13. La abundancia estacional de las Biomphalarias mostro un patrón opuesto al de *L. columella*, sugiriendo una posible interacción negativa entre ambos, como la competencia por los recursos,

5.7.14. Todos los ejemplares de *L. columella* pertenecen a una única población, cuyos individuos pueden dispersarse libremente entre los ambientes estudiados cuando estos están conectados en primavera,

5.7.15. Con respecto a la dinámica poblacional, *L. columella* presentó un reclutamiento continuo de nuevos individuos entre otoño y primavera,

5.7.16. En primavera y en otoño la población alcanzó el máximo potencial reproductivo; en invierno todas las categorías de tamaños estuvieron presentes y se encontraron los caracoles más grandes; en verano, la falta de reclutamiento y la presencia casi exclusiva de individuos medianos estaría reflejando el impacto negativo de las condiciones ambientales desfavorables sobre la población de *L. columella,*

5.7.17. Se produjeron, al menos, tres generaciones superpuestas por año.

Durante el período seco y el de recarga:

5.7.18. La ausencia de caracoles durante el período seco y la menor abundancia de *L. columella* en el período de recarga, refleja el efecto negativo de una sequía continua de 6 meses de duración sobre la población

5.7.19. En el período de recarga la abundancia aumentó al aumentar las precipitaciones

5.7.20. Si bien no se encontraron *L. columella* sobre o debajo de la tierra durante el período seco, el hallazgo de individuos inmediatamente después de la sequía, permite suponer que éstos estaban enterrados estivando,

5.7.21. Las *L. columella* medianas parecen ser las más resistentes a las condiciones ambientales desfavorables ya que predominaron en los veranos y antes e inmediatamente después de la sequía,

5.7.22. La población se recuperó rápidamente en cuanto mejoraron las condiciones ambientales alcanzando valores de abundancia similares a los observados antes de la sequía.

Capítulo 6

DINÁMICA DE TRANSMISIÓN DE *Fasciola hepatica*

6.1 Introducción

La transmisión de la fasciolosis tiene fuertes determinantes ambientales, ya que la biología de los hospedadores intermediarios (caracoles lymneidos), el desarrollo del parásito en éstos y la supervivencia de los estadios de vida libre del parásito en el ambiente dependen de factores abióticos, principalmente de características fisiográficas y de factores climáticos (Nari *et al.*, 1983).

La propagación y la continuidad temporal de esta parasitosis se ven favorecidas por las siguientes características particulares del ciclo de transmisión: 1) La gran expectativa de vida de las fasciolas adultas en el hospedador definitivo (e.g.: en ovinos entre 8 y 11 años (Andrews, 1999), en bovinos entre 1 y 2 años (Rangel-Ruiz *et al.*, 1999), 2) El elevado número de huevos que cada adulto puede producir diariamente (entre 8.000 y 25.000 aprox.), 3) La capacidad de infectar a una gran variedad de hospedadores definitivos, domésticos y silvestres, 4) La elevada presión de pastoreo que contribuye a la continua contaminación de las pasturas con huevos de *Fasciola hepatica*, 5) La gran multiplicación asexual del parásito en el caracol, 6) La resistencia de las metacercarias en el ambiente, 7) La alta tasa de reproducción de los lymneidos que son capaces de poner 25.000 huevos por individuo adulto, 8) La resistencia de los lymneidos a condiciones ambientales adversas como sequías y temperaturas extremas, etc., 9) La capacidad de los lymneidos para desarrollarse en una amplia variedad de ambientes dulceacuícolas, 10) La capacidad de estos caracoles para montar poblaciones abundantes y estables en el tiempo, a partir de un único individuo debido a su condición de hermafroditas.

El ciclo de vida de *F. hepatica* sólo puede completarse satisfactoriamente si el ambiente provee condiciones favorables de **humedad** y **temperatura,** ya que estos factores afectan el

desarrollo de los hospedadores intermediarios y el del parásito dentro y fuera de estos, determinando los períodos en los cuales la transmisión es posible (Torgerson y Claxton, 1999). *Fasciola hepatica* requiere de humedad para su transmisión, proliferación y supervivencia: los huevos sólo se desarrollan en ambientes húmedos y fuera de la materia fecal, los miracidios necesitan ambientes con agua para nadar y encontrar al caracol, los caracoles viven y se desarrollan en ambientes acuáticos, las cercarias no emergen del caracol a menos que haya llovido recientemente y las metacercarias necesitan humedad para sobrevivir y mantenerse infectivas (Torgerson y Claxton, 1999). La temperatura, por su parte, también afecta tanto a los estadios larvales del parásito como al caracol, ya que el desarrollo normal de los huevos de *F. hepatica* y de los lymneidos sólo ocurre entre 9,5 y 30ºC y dentro de este rango, la velocidad de desarrollo disminuye al aumentar la temperatura; las metacercarias pueden sobrevivir varios meses a temperaturas bajo cero pero su supervivencia y viabilidad se ven afectadas por las altas temperaturas (Torgerson y Claxton, 1999).

Con respecto al **hospedador intermediario**, la prevalencia por *F. hepatica* es muy variable con valores que oscilan entre 0,01% y 88,3% (Malone *et al.*, 1984; Rognlie *et al.*, 1996), aunque en general raramente superan el 15% (Amato *et al.*, 1986; Kleiman *et al.*, 2007). Estos resultados reflejan como *F. hepatica* es capaz de propagarse infectando unos pocos caracoles dentro de una población, seguramente debido a su gran capacidad de multiplicación asexual dentro del hospedador intermediario (Rognlie *et al.*, 1996). En condiciones naturales se observó que la prevalencia por *F. hepatica* aumenta con el tamaño de los caracoles (Graham, 2003; Manga-Gonzalez *et al.*, 1991; Sorensen y Minchella, 2001) lo cual está relacionado con que los caracoles más grandes son también más viejos (Minchella *et al*., 1985) y poseen mayor tiempo de exposición al parásito (Woolhouse, 1989). Los estadios larvales de *F. hepatica* pueden generar efectos negativos en el caracol infectado como castración o reducción de la fecundidad, aumento de la mortalidad, gigantismo o disminución de la tasa de crecimiento y aumento de la sensibilidad al stress ambiental (Dreyfuss *et al.*, 1999; Graczyk y Fried, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2002a; Minchella *et al.*, 1985; Salazar *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista epidemiológico, muchas veces no existe una relación directa entre la prevalencia de los caracoles y la de los hospedadores definitivos (Amato *et al.*, 1986) debido a que las metacercarias no siempre son consumidas inmediatamente después de formarse y como estas se mantienen viables e infectivas durante mucho tiempo bajo diversas condiciones ambientales, el ganado puede infectarse aun cuando los caracoles no estén presenten (Roberts y Suhardono, 1996). La prevalencia de los hospedadores está

íntimamente relacionada con la temperatura que, como ya se mencionó, regula el tiempo de desarrollo de los estadios de vida libre del parásito y la disponibilidad de hospedadores intermediarios susceptibles.

Por lo anteriormente expuesto, la erradicación de la fasciolosis, como la de la mayoría de las enfermedades parasitarias, es prácticamente imposible y los esfuerzos de las autoridades sanitarias están destinados a reducir la prevalencia e intensidad de las infecciones mediante la implementación de programas de control (Torgerson y Claxton, 1999). En los últimos años se ha trabajado mucho en el **control de la fasciolosis** y, a pesar de que se han propuesto numerosas estrategias de control, como la aplicación de vacunas (Spithill *et al*., 1999), de molusquicidas (Roberts y Suhardono, 1996), de control biológico de los caracoles hospedadores intermediarios mediante competidores y/o predadores (Roberts y Suhardono, 1996) y de control biológico de *F. hepatica* dentro del caracol (Boray, 1967), la aplicación de antihelmínticos en el hospedador definitivo resulta la práctica más común para controlar esta parasitosis (Cringoli *et al.*, 2006). El objetivo del tratamiento es el de eliminar al parásito adulto e interrumpir la eliminación de huevos con la materia fecal, para reducir la infección en los caracoles y la contaminación de las pasturas (Olaechea, 2007).

Las drogas utilizadas en el tratamiento antihelmíntico juegan un papel muy importante en el control de la fasciolosis. Un programa eficiente de control debe basarse en la aplicación del mínimo número de tratamientos anuales y debe apuntar a reducir la contaminación de las pasturas a largo plazo y requiere el uso de drogas que sean efectivas contra los estadios maduros e inmaduros del parásito (Boray, 1993). Si la droga utilizada es sólo efectiva contra parásitos adultos, es necesario aplicar tratamientos más frecuentes (Boray, 1993) y ahí es donde entra en juego la resistencia del parásito a las drogas.

Como se mencionó en el Capítulo 1, *F. hepatica* puede infectar a una gran variedad de **hospedadores definitivos** (equinos, porcinos, bovinos, lagomorfos, ovinos, caprinos, camélidos, roedores, etc.), que presentan distintos grados de susceptibilidad y de resistencia al parásito (Olaechea, 2007). Los ovinos y los bovinos son los hospedadores más importantes desde un punto de vista epidemiológico y el desarrollo de la infección tiene marcadas diferencias entre ellos. Los ovinos y los bovinos son muy susceptibles al parásito, pero mientras que en los primeros la edad y el sexo no afectan el nivel de infección, en los segundos sí (Olaechea, 2007). Un estudio realizado en España reveló que la prevalencia aumenta con la edad en bovinos de hasta 4 años, momento a partir del cual se mantiene constante en niveles de aproximadamente el 40%, hasta las edades máximas registradas (11-18 años) (Gonzalez-Lanza *et al*., 1989). Estos autores sugieren que el hecho de que los animales jóvenes estén menos infectados que los animales de 3-4 años está relacionado con el menor tiempo de exposición de los primeros a las pasturas infectadas. El hecho de

que se mantenga constante y alta la prevalencia de infección en ganado bovino viejo, estaría reflejando que se alcanzó un equilibrio entre la tasas de adquisición y de muerte del parásito (Torgerson y Claxton, 1999). Otra diferencia entre los ovinos y bovinos es la resistencia que presentan a la infección por *F. hepatica*. Los ovinos infectados no desarrollan resistencia frente a futuras infecciones y constituyen el grupo que más contribuye a la contaminación de las pasturas (Olaechea, 2007). Por el contrario, los bovinos adultos sí suelen desarrollar cierta resistencia adquirida frente a *F. hepatica* (Torgerson y Claxton, 1999), aunque recientemente se ha planteado que la protección a la re-infección es parcial y que los animales con infecciones naturales crónicas, son tan susceptibles al parásito como aquellos que nunca estuvieron en contacto con él (Clery *et al.*, 1996).

Otro aspecto a tener en cuenta es el **costo de las drogas antihelmínticas** y en este sentido los tratamientos deben ser viables y estar sustentados por análisis previos de sus costos y beneficios (Roberts y Suhardono, 1996). Una manera de reducir la cantidad de aplicaciones de la droga y por lo tanto sus costos es realizar un control integral de la fasciolosis que combine la aplicación de drogas con el manejo de los cuerpos de agua, ya sea cercándolos para evitar el contacto entre los caracoles y el ganado o drenándolos para reducir su caudal e importancia y con el manejo de las pasturas mediante la rotación del ganado (Roberts y Suhardono, 1996).

Para implementar programas racionales y sostenibles de control de los helmintos, es necesario contar con un amplio conocimiento de la epidemiología del parásito y su interacción con los hospedadores, bajo un determinado clima y conociendo el sistema de manejo al cual son sometidos los animales (Keyyu *et al*., 2005).

6.2 Objetivos

Objetivos generales

a) Describir la dinámica de transmisión de *Fasciola hepatica* en el norte de la Provincia de Corrientes,
b) Identificar los factores claves que influyen en la transmisión,
c) Determinar las épocas del año en las que tiene lugar la transmisión,
d) Estudiar el impacto de una sequía de 6 meses de duración en la dinámica de transmisión de *F. hepatica*,
e) Elaborar una propuesta de control adecuada a las características epidemiológicas locales**.**

Objetivos parciales

- Evaluar la prevalencia por *F. hepatica* en el ganado bovino,
- Identificar al/los grupos etarios con mayor prevalencia,
- Estudiar los niveles de infección por *F. hepatica* en dos cohortes desde su nacimiento y hasta los 12 meses de edad,

- Evaluar la prevalencia por *F. hepatica* en *L. columella*,
- Relacionar la prevalencia en *L. columella* con su abundancia y dinámica poblacional,
- Relacionar la prevalencia en *L. columella* con las variables climáticas,
- Identificar los ambientes donde se ve favorecida la transmisión y relacionar la prevalencia en *L. columella* con las variables ambientales,

- Estudiar las variaciones temporales de la prevalencia en ambos hospedadores y su relación con las variables climáticas,

6.3. Hipótesis

La transmisión de *Fasciola hepatica* en el norte de la Provincia de Corrientes ocurre durante todo el año, con altas prevalencias de infección en el hospedador definitivo e intermediario.

Las condiciones climáticas (temperatura media mensual del aire entre 10 y 30ºC y altas precipitaciones) y topográficas (humedales temporarios) de la zona son favorables para el desarrollo de *L. columella* y el desarrollo del parásito dentro y fuera del caracol durante todo el año. Estas circunstancias favorecen un contacto más frecuente e intenso entre los hospedadores y el parásito, aumentando la eficiencia del ciclo de transmisión. Como consecuencia, se observan prevalencias mayores en ambos hospedadores en comparación con las registradas en Regiones donde el ciclo de transmisión se ve interrumpido por

condiciones ambientales adversas, como el período invernal en la Región Patagónica de Argentina (Kleiman *et al*., 2007).

6.4. **Metodología** (en Capítulo 3, secciones **3.3**: Hospedador definitivo y **3.4**: Hospedador intermediario)

6.5. Resultados

Los resultados que se presentan a continuación fueron analizados considerando los períodos en los que se dividió el estudio en base a los resultados del balance hídrico realizado para el período de estudio (Fig. 3.2; Sección 3.2; Capítulo 3).

6.5.1. Infección en el hospedador definitivo

6.5.1.1. Infección por *F. hepatica* en el primer período húmedo

En la Tabla 6.1 se muestra el número de bovinos muestreado por grupo etario durante el primer período húmedo. En **primavera de 2002** se tomaron muestras de materia fecal a 25 terneros que no habían recibido ningún tratamiento antiparasitario y a 51 vacas que habían sido desparasitadas con Albendazol en primavera de 2001. En **verano** se muestrearon 36 vaquillonas y 17 vacas, las cuales habían recibido la última dosis de Albendazol 4 meses antes. En **otoño** se tomaron muestras de materia fecal a 20 vaquillonas y a 39 vacas las cuales habían recibido el último tratamiento antiparasitario con Albendazol el verano anterior. Por último, en **primavera de 2003** se muestrearon 101 vaquillonas que habían recibido una dosis de Ivermectina al ser destetadas en abril de 2003.

En la Tabla 6.1 también se muestra la prevalencia de infección por *F. hepatica* por estación y por categoría etaria. La prevalencia de infección por *F. hepatica* durante el primer período húmedo osciló entre 8% y 95%. Al analizar la prevalencia entre grupos etarios por estación se observó que en primavera de 2002 la prevalencia de *F. hepatica* en las vacas fue significativamente mayor que en los terneros ($\chi^2_{(1)}$= 4,1; p= 0,04). Por el contrario, la prevalencia entre vacas y vaquillonas no difirió ni en verano ($\chi^2_{(1)}$= 0,1; p= 0,73) ni en otoño ($\chi^2_{(1)}$= 3,1; p= 0,08).

La comparación de la prevalencia de *F. hepatica* por categoría etaria entre estaciones sólo fue posible para las vacas y las vaquillonas, ya que los terneros solo pudieron muestrearse en la primavera de 2002. La prevalencia estacional mostró diferencias significativas tanto en las vacas ($\chi^2_{(2)}$= 16,2; p< 0,001) como en las vaquillonas ($\chi^2_{(2)}$= 74,8; p< 0,001). En las vacas la prevalencia en otoño (77%) fue significativamente mayor a la registrada en primavera de 2002 (45%; p<0,01) y en verano (24%; p<0,01), mientras que estas dos últimas no difirieron entre sí (p>0,05). Para las vaquillonas la prevalencia registrada en otoño (95%) resultó significativamente mayor que la registrada en verano

(19%; p<0,001) y en primavera de 2003 (8%; p<0,001), mientras que no hubo diferencias entre estas dos últimas (p>0,05) (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Prevalencia de infección por *Fasciola hepatica* en bovinos de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina, durante el primer período húmedo.

	Primer período húmedo							
Estación	primavera (02´)		verano		otoño		primavera (03´)	
Categoría etaria	N	P	N	P	N	P	N	P
Terneros	25	20%^{a}						
Vaquillonas			36	19%^{aA}	20	95%^{aB}	101	8%^{A}
Vacas	51	45%^{bA}	17	24%^{aA}	39	77%^{aB}		
Total	**76**	**37%**	**53**	**21%**	**59**	**83%**	**101**	**8%**

N: Número de animales muestreados; P: Prevalencia

Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05) entre categorías etarias por estación

Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p< 0,05) por categoría etaria entre estaciones.

La mediana del número de huevos de *F. hepatica* hallados por gramo de materia fecal (hpg) durante el primer período húmedo fue baja y osciló entre 0,13 y 1,0 (Tabla 6.2).

En verano el hpg de las vaquillonas no difirió del de las vacas (U= 9, p= 0,34), mientras que en otoño fue significativamente mayor (U= 172, p= 0,02). También se encontraron diferencias significativas en el hpg de las vacas y de las vaquillonas entre estaciones ($H_{(2)}$= 6,5; p= 0,04 y $H_{(2)}$= 17,5; p= 0,002, respectivamente). En el caso de las vacas el hpg registrado en otoño resultó significativamente mayor que el de primavera de 2002 (p<0,01) pero no que el de verano (p>0,05) (Tabla 6.2), mientras que entre las vaquillonas el hpg de otoño resultó mayor que en las otras dos estaciones (p<0,005).

Tabla 6.2: Número de huevos de *Fasciola hepatica* por gramo de materia fecal (hpg) en bovinos de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina, durante el primer período húmedo.

	Primer período húmedo							
Estación	primavera (02´)		verano		otoño		primavera (03´)	
Categoría etaria	M	C1-C3	M	C1-C3	M	C1-C3	M	C1-C3
Terneros	-	-						
Vaquillonas			0,13^{aA}	0,1-0,4	1,00^{aB}	0,4-3,6	0,25^{A}	0,1-0,3
Vacas	0,25^{A}	0,1-0,4	0,31^{aB}	0,1-1,1	0,50^{bB}	0,3-0,8		

Ref.: M: Mediana; C1: Cuartil 1 (25%); C3: Cuartil 3 (75%)

Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05) entre categorías etarias por estación

Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p< 0,05) por categoría etaria entre estaciones.

6.5.1.2. Infección por *F. hepatica* en 2 cohortes en el período seco, de recarga y segundo período húmedo

Primera cohorte

La primera cohorte estaba formada por las hembras nacidas en el establecimiento “Don Ricardo” en noviembre de 2003. El número de animales muestreados en cada oportunidad varió según la disponibilidad de obtención de heces. Se tomaron muestras de materia fecal de esta cohorte en 5 oportunidades como se detalla en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Cronograma de muestreos de la primera cohorte de ganado bovino nacida en noviembre de 2003 en el establecimiento "Don Ricardo", Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina.

Muestreos	Período	Estación	N	Edad del ganado (meses)	Categoría etaria
1	**Seco**	Otoño	72	5	ternero
2	(abril - agosto 2004)	Invierno	77	7	vaquillona
3	**de Recarga** (septiembre - octubre 2004)	principios de primavera (04´)	74	10	vaquillona
4	**Segundo húmedo**	primavera (04´)	80	12	vaquillona
5	(noviembre 2004 – diciembre 2005)	primavera (05´)	26	24	vaquillona

N: Número de animales muestreados

Estos animales permanecieron en el establecimiento hasta los 14 meses, momento a partir del cual fueron trasladados temporalmente a otro establecimiento ganadero ubicado en la localidad de Ita Ibaté, sin antecedentes de fasciolosis. En el muestreo de primavera de 2005 se tomó muestra de materia fecal a los animales de esta cohorte que regresaron de dicho establecimiento.

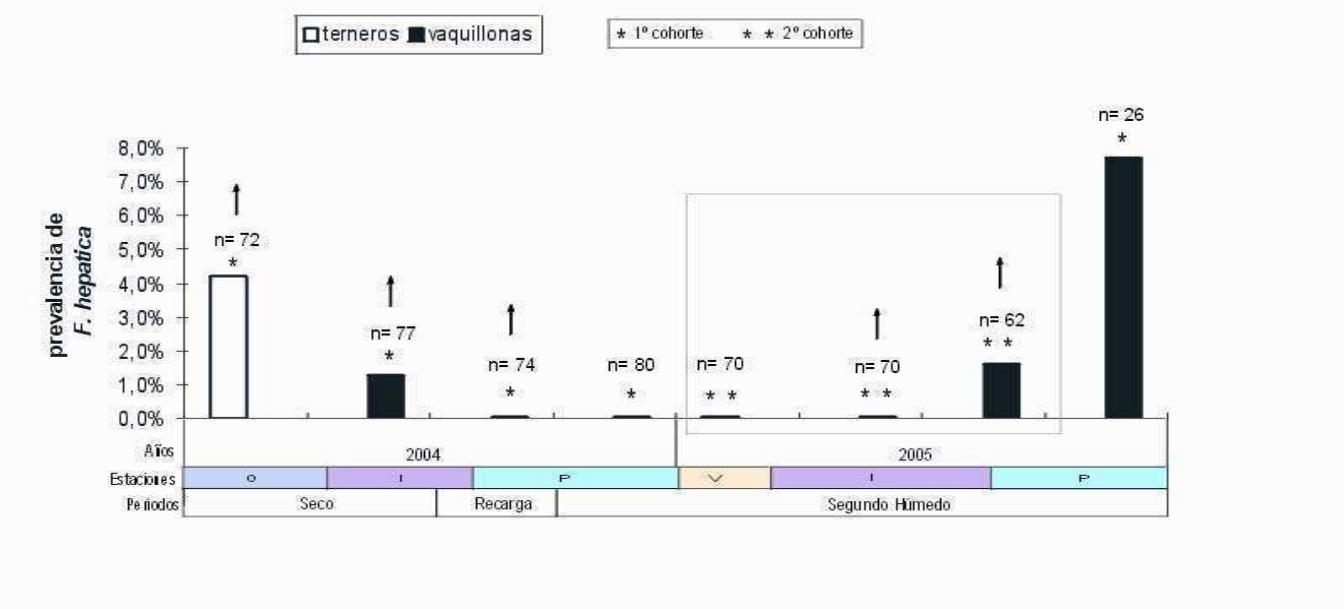
El tratamiento antiparasitario recibido por esta primera cohorte consistió en la aplicación de Albendazol en otoño, invierno y principios de primavera de 2004. No recibieron tratamiento durante su estadía en Itá Ibaté ni en el muestreo de primavera de 2005.

En la Figura 6.1 se muestra la prevalencia de *F. hepatica* registrada en esta cohorte durante el período seco, el de recarga y el segundo período húmedo. En otoño del período seco los animales eran terneros y su prevalencia fue de 4,2%. En invierno de este mismo período los animales se habían convertido en vaquillonas y su prevalencia descendió a 1,3% (Fig. 6.1). En el período de recarga y en la primavera de 2004 del segundo período húmedo no se hallaron animales infectados (Fig. 6.1). No se encontraron diferencias entre estas 4 prevalencias ($Q_{(3)}$= 6; p= 0,11). En la primavera de 2005 durante el segundo período

húmedo, cuando algunos animales de esta cohorte regresaron del establecimiento en Itá Ibaté, se registró una prevalencia del 7,7% (Fig. 6.1).

La mediana del número de huevos por gramo de materia fecal fue de 0,13 (C_1:C_3= 0,13) en todos los muestreos donde se registró infección.

Figura 6.1: Prevalencia de *Fasciola hepatica* en dos cohortes de ganado bovino de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina. Las flechas indican los tratamientos con Albendazol, n: número de animales muestreados.



Segunda cohorte

La segunda cohorte estaba formada por las hembras nacidas en el establecimiento “Don Ricardo” en noviembre de 2004. Estos animales fueron muestreados exclusivamente durante el segundo período húmedo en verano cuando todavía eran terneros (n= 70, 4 meses), en invierno (n= 70, 8 meses) y a principios de primavera de 2005 (n= 62, 11 meses) como vaquillonas (Fig. 6.1). Estos animales fueron desparasitados con Albendazol en los últimos dos muestreos.

En la Figura 6.1 se muestra la prevalencia de *F. hepatica* registrada en esta cohorte durante el segundo período húmedo. En verano e invierno no se encontraron animales infectados y a principios de primavera de 2005 se registró una prevalencia de 1,7% (Fig. 6.1). En este último muestreo se registró una mediana de huevos por gramo de materia fecal de 0,13. No se encontraron diferencias significativas entre las prevalencias registradas para la segunda cohorte (p> 0,05).

6.5.1.3. Infección por *F. hepatica* por categoría etaria entre períodos

La comparación de la prevalencia entre períodos sólo fue posible para los terneros y las vaquillonas ya que los individuos de la primera y la segunda cohorte fueron muestreados hasta los 24 y los 11 meses, respectivamente, ambas edades incluidas en la categoría de vaquillonas.

La Tabla 6.4 resume los muestreos realizados en terneros y en vaquillonas durante todo el período de estudio y la prevalencia por *F. hepatica* registrada en cada oportunidad.

La prevalencia por *F. hepatica* en los terneros mostró diferencias entre períodos ($\chi^2_{(2)}$= 16,26, p< 0,001). La prevalencia registrada en la primavera de 2002 del primer período húmedo fue significativamente mayor a la registrada en otoño del período seco (p< 0,05) y en verano del segundo período húmedo (p< 0,05).

Tabla 6.4: Prevalencia por *Fasciola hepatica* en terneros y en vaquillonas durante el estudio.

	Períodos											
	Primer húmedo				**Seco**		**Recarga**	**Segundo húmedo**				
Estación	P (02`)	V	O	P (03`)	O	I	ppios P	P (04`)	V	I	ppios P	P (05`)
Terneros	20,0%				4,5%			0,0%				
Vaquillonas		19,0%	95,0%	8,0%		1,3%	0,0%	0,0%		0,0%	1,7%	7,7%

P: primavera, V: verano, O: otoño, I: invierno, ppios P: principios de primavera

La prevalencia por *F. hepatica* en las vaquillonas también mostró diferencias entre períodos ($\chi^2_{(8)}$= 230,47; p< 0,001). La prevalencia registrada en otoño del primer período húmedo fue significativamente mayor a todas las demás (p< 0,001). A su vez, la prevalencia en verano del primer período húmedo (19%) resultó significativamente mayor a la de invierno del período seco (1,3%, p< 0,001) y a la de principios de primavera del segundo período húmedo (1,7%, p< 0,001). El resto de las combinaciones de a pares no mostraron diferencias (p> 0,05).

6.5.2. Infección en el hospedador intermediario

6.5.2.1. Generalidades de la infección por *F. hepatica* en *L. columella*

Durante todo el período de estudio, de los 7851 caracoles *Lymnaea columella* medidos, se examinaron parásitológicamente 6050 (77%). De éstos, 128 contenían cercarias maduras de *F. hepatica*. Por lo tanto, la **prevalencia general** de infección natural por *F. hepatica* en *L. columella* fue de **2,1%** (128/6050).

El subconjunto de caracoles infectados con cercarias maduras de *F. hepatica* que también fue analizado por PCR dió positivo a la secuencia del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa de *F. hepatica* (Cucher *et al*., 2006). A su vez, las cercarias identificadas morfológicamente como *F. hepatica* se enquistaron espontáneamente sobre distintas superficies como las paredes y el fondo de las cajas de petri, la conchilla de otros caracoles, etc. Además, las ratas infectadas con las metacercarias emitidas por *L. columella* presentaron a partir del día 44 post-infección adultos en los ductos biliares cuyos caracteres morfológicos coincidieron con los de *F. hepatica*.

En forma adicional, se encontraron 29 *L. columella* infectadas con redias cuyas características morfológicas coincidían con las de *F. hepatica* (intestino largo y apófisis en el segundo tercio de su cuerpo). Como se mencionó en el Capítulo 1 (Pág. 15), las redias no se utilizan para identificar morfológicamente a *F. hepatica* porque comparten muchos caracteres con otros trematodes de la superfamilia Echinostomatoidea (e.g. *Echinostoma* sp., *Echinoparyphium* sp, *Paramphistomum* sp, etc). Sin embargo, el hecho de que en éste estudio no se encontraran otros trematodes pertenecientes a esta superfamilia, permitiría suponer que las redias halladas en *L. columella* pertenecen a *F. hepatica.* De hecho, la identidad de éstas se confirmó por PCR, ya que todos los caracoles infectados con redias dieron positivos a la secuencia del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa de *F. hepatica* (Cucher *et al*., 2006). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados la prevalencia de infección natural ascendería a **2,6%** (157/6050).

En la Figura 6.2 se presentan imágenes de todos los estadios larvales de *F. hepatica* encontrados en *L. columella* a lo largo del período de estudio. Las redias inmaduras presentaron las características típicas de *F. hepatica*, como la presencia de una boca, una faringe, un intestino corto y sin ramificaciones y un cuerpo cilíndrico con dos apéndices laterales en el último tercio (Fig. 6.2 B). Las redias maduras exhibieron las mismas

características que las inmaduras, más la presencia de cercarias con distintos grado de maduración en su interior (Fig. 6.2 C,D,E). Las cercarias maduras se observaron bajo microscopio estereoscópico y óptico. Estas presentaron las características típicas de las cercarias de *F. hepatica*, como un cuerpo de 200-250 µm de largo, relativamente oscuro, con canales excretores con escasos corpúsculos calcáreos grandes y una cola 2 veces más larga que el cuerpo (500-600 µm) y sin velos natatorios (Fig. 6.2 F,G,H,I). Con respecto al comportamiento, exhibieron los movimientos característicos de la especie en los cuales el cuerpo se estira y contrae mientras la cola se mueve activamente a ambos lados (Fig. 6.2 F,G,H). Las cercarias buscaban activamente un sustrato donde fijarse para iniciar el proceso de enquistamiento mediante el cual fijaron su cuerpo a través de su ventosa ventral y comenzaron a secretar una sustancia viscosa que las cubrió (Fig. 6.2 K,L). Una vez formado el quiste se desprendió la cola y la cubierta protectora se volvió más opaca y resistente (Fig. 6.2 M).

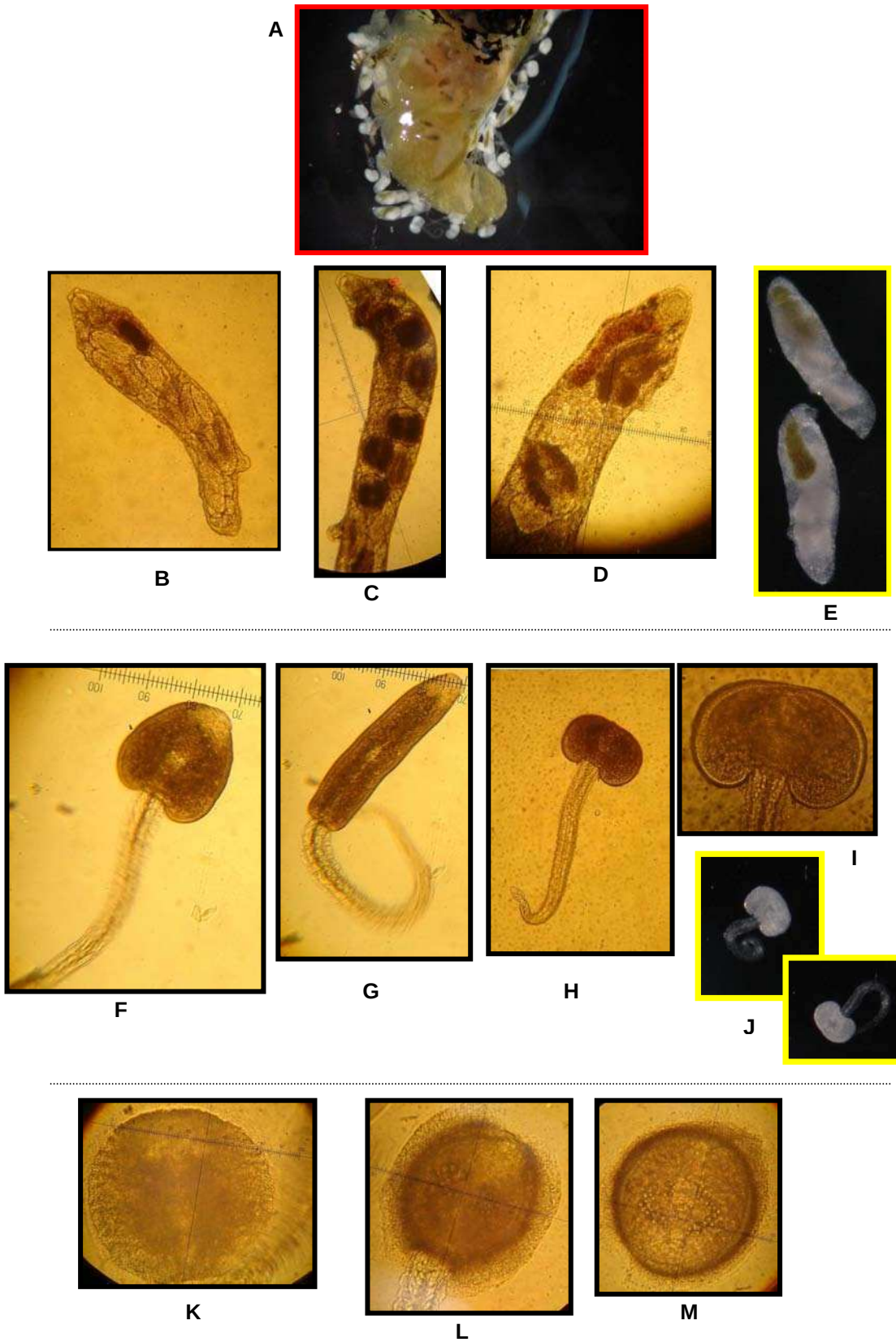
6.5.2.2. Infección por *F. hepatica* en *L. columella* durante el período de estudio

Los análisis de la infección por *F. hepatica* en *L. columella* que se describen a continuación fueron realizados exclusivamente con los caracoles infectados con cercarias maduras de *F. hepatica* (n= 128).

Durante el estudio se registró infección por *F. hepatica* en *L. columella* sólo en los períodos húmedos. La prevalencia general durante el primer período húmedo (**7,24%**= 127/1754) fue significativamente mayor a la del segundo período húmedo (**0,03%**= 1/3167) ($\chi^2_{(1)}$= 231,5; p<0,001).

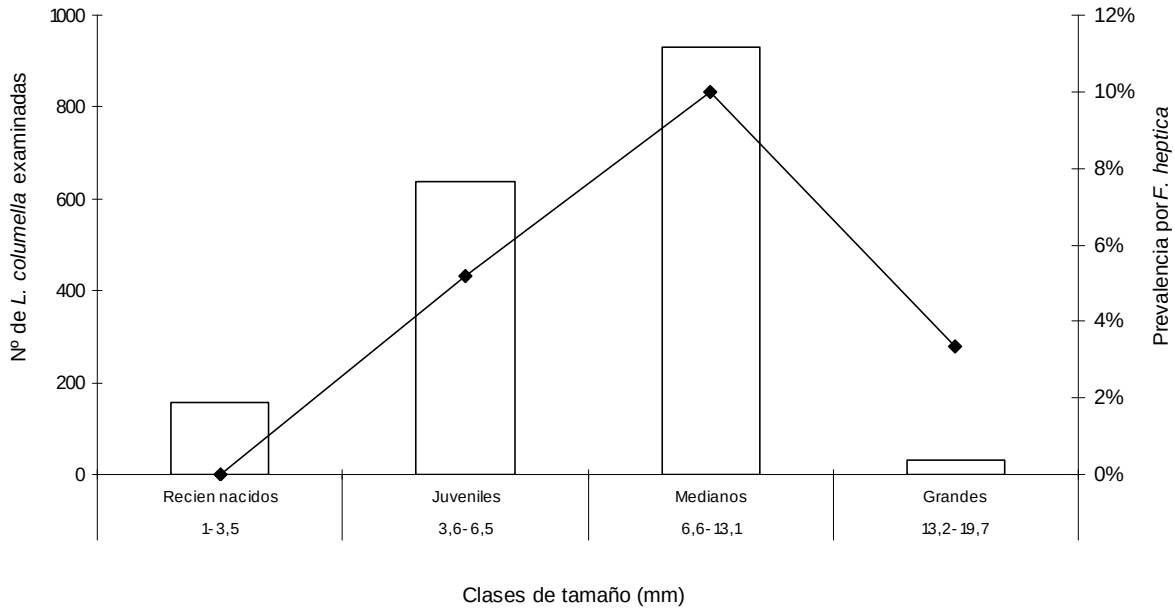
Durante el segundo período húmedo (2º PH) la única *L. columella* infectada fue hallada en el borde del Bañado, mientras que en el primer período húmedo (1º PH) el 94,5% de los caracoles infectados fue hallado en los canales anchos del Malezal, el 3,9% en el borde del Bañado y el 1,6% restante, en los canales angostos del Malezal. La prevalencia dentro del 1ºPH difirió entre ambientes ($\chi^2_{(2)}$= 44,2; p< 0,001), siendo en los canales anchos del Malezal (120/1396= 8,6%) significativamente mayor que en los canales angostos del Malezal (2/68= 2,9%; p< 0,001) y que en el borde del Bañado (5/290= 1,7%; p< 0,001). Entre éstos dos últimos no se hallaron diferencias (p> 0,05). Al igual que para la prevalencia general, la prevalencia en el borde del Bañado fue significativamente mayor antes de la sequía (1º PH) que después (1,7% vs 0,1%, respectivamente; $\chi^2_{(1)}$= 24,7; p< 0,001)

Figura 6.2: Infección natural de *Fasciola hepatica* en *Lymnaea columella* de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina. **A.** Hepatopancreas de *L. columella* con redias y cercarias de *F. hepatica*; **B.** Redia inmadura; **C-D.** Redias maduras con cercarias, **E.** Redias (aspecto bajo el microscopio estereoscópico), **F,G,H.** Cercarias maduras, movimientos típicos, **I.** Cabeza de cercaria madura, **J.** Cercarias maduras (aspecto bajo el microscopio estereoscópico), **K.** Cercaria enquistándose, **L.** Metacercaria formada recientemente que aún conserva la cola de la cercaria, **M.** Metacercaria.



Durante el 2ºPH la única *L. columella* infectada medía 11,9 mm y pertenecía a clase de tamaño “mediano” (6,6-13,1 mm). El largo de la conchilla de los caracoles infectados en el 1º PH (n= 127) osciló entre 3,6 y 13,9 mm con una mediana de 7,7 mm. De éstos, el 26,0% eran juveniles (3,6-6,5 mm), el 73,2% medianos y el 0,8% restante, grandes (13,2-19,7 mm). Claramente los caracoles medianos predominaron entre los infectados ya que su proporción fue significativamente mayor a la de juveniles y grandes ($p< 0,001$) y la de juveniles resultó significativamente mayor que la de los grandes ($p< 0,001$). En la Figura 6.3 se muestra como esta misma relación se observó para la prevalencia de infección por clase de tamaño, ya que el número de infectados entre los caracoles medianos examinados fue significativamente mayor que entre los juveniles y los grandes ($p< 0,01$). Entre los recién nacidos examinados no se encontraron infectados.

Figura 6.3: Número de *Lymnaea columella* examinadas parásitológicamente (barra) y prevalencia de infección por *Fasciola hepatica* (línea) por clase de tamaño.



En la Tabla 6.5 se muestran los valores generales de la abundancia, el rango de tamaños y la prevalencia de *L. columella* en el primer y segundo período húmedo. En ambos períodos se observó una relación inversa entre la prevalencia y la abundancia de *L. columella* y entre la prevalencia y el tamaño máximo alcanzado por *L. columella* (los resultados de la abundancia y el tamaño fueron analizados en detalle en el capítulo 5, secciones 5.5.2 y 5.5.4, respectivamente).

Tabla 6.5: Abundancia, tamaño y prevalencia de infección de *Lymnaea columella* en el primer y segundo período húmedo.

	Períodos	
	1ºPH	2ºPH
Abundancia (caracoles/30 min)	170,9	384,1
Largo de la conchilla (mm)	1,9-15,3	1,1-25,3
Prevalencia (%)	7,24	0,03

1ºPH: primer período húmedo; 2ºPH: segundo período húmedo.

6.5.2.2.1. **Infección por *F. hepatica* en *L. columella* en el primer período húmedo por estación**

En el primer período húmedo se hallaron caracoles infectados con *F. hepatica* en **otoño**, **invierno** y **verano de 2004**. La prevalencia no mostró diferencias estacionales (p> 0,05), observándose en otoño **9,0%** (46/510), en invierno **7,5%** (79/1059) y en verano de 2004 **6,3%** (2/32) (Fig. 6.4 A). En la Figura 6.4 se muestra la relación entre la prevalencia en *L. columella,* su tamaño, abundancia y la temperatura del aire. La prevalencia por *F. hepatica* en *L. columella* no estuvo correlacionada con la abundancia del caracol (rs= 0,64; p= 0,17) ya que se encontraron caracoles infectados en estaciones con abundancias altas (otoño e invierno) y con abundancias bajas (verano de 2004) (Fig. 6.4 A,C). La prevalencia en *L. columella* tampoco mostró correlación con la temperatura mínima, media y máxima estacional del aire (rs: -0,64; rs: -0,58 y rs: -0,21, respectivamente, p> 0,05) ya que se hallaron caracoles infectados tanto en invierno como en verano (Fig. 6.4 A,D).

En la Tabla 6.6 se muestra la prevalencia por *F. hepatica* en otoño, invierno y verano (2004) discriminada por ambiente y por el tamaño de *L. columella*. En **otoño** la prevalencia de los juveniles y medianos fue similar, en **invierno** la prevalencia de los medianos fue significativamente mayor que la de los juveniles y grandes y en **verano de 2004** se observó que la prevalencia de los juveniles fue mayor que la de los medianos (Tabla 6.6 A).

En otoño y en invierno la prevalencia por *F. hepatica* no difirió entre ambientes (Tabla 6.6 B). En verano de 2004 sólo se examinaron caracoles provenientes del borde del Bañado ya que, como se informó en el capítulo 5, los canales anchos y los angostos del Malezal estaban completamente secos y sin caracoles.

Figura 6.4: Prevalencia de infección, tamaño y abundancia de *L. columella* de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina, durante el primer período húmedo. **A.** Prevalencia de infección natural por *F. hepatica* en *L. columella*, **B.** Largo mediano de la conchilla de *L. columella*; **C.** Abundancia de *L. columella*, **D.** Temperatura media (rombo) y máxima (guión) mensual del aire (ºC).

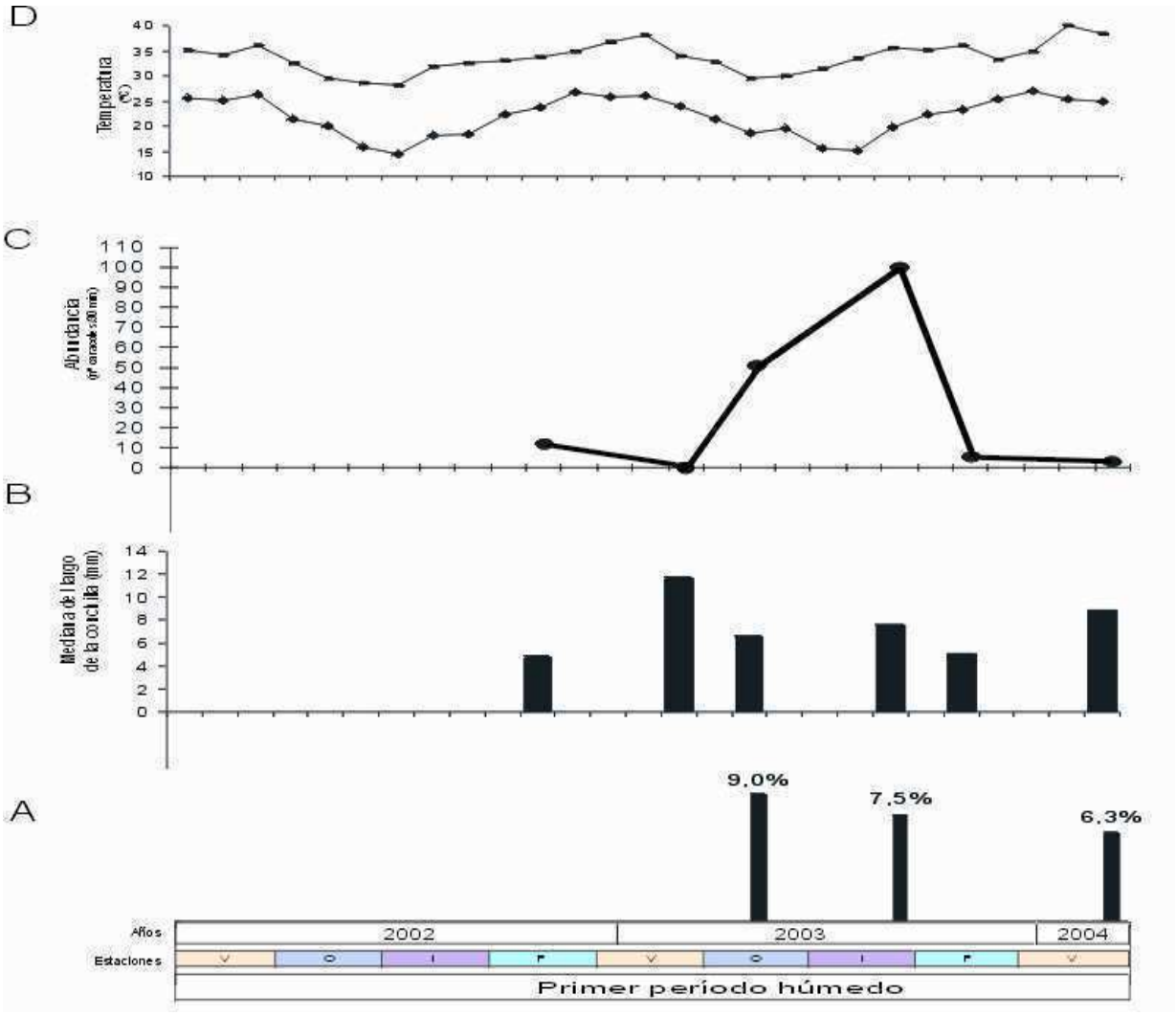


Tabla 6.6: Prevalencia estacional por *F. hepatica* en *L. columella* durante el primer período húmedo. **A.** Prevalencia estacional por tamaño de *L. columella*, **B.** Prevalencia estacional por ambiente.

	Primer período húmedo					
Estación	otoño (n= 510)		invierno (n= 1059)		verano 04` (n= 32)	
A. por clase de tamaño	n	P (%)	n	P (%)	n	P (%)
Recién nacidos (1,1 - 3,5 mm)	13	0,0	110	0,0	-	-
Juveniles (3,6 - 6,5 mm)	201	$7,0^{aA}$	350	$5,1^{aA}$	2	$50,0^{aB}$
Medianos (6,6 - 13,1 mm)	296	$10,8^{aA}$	569	$10,5^{bA}$	30	$3,3^{bB}$
Grandes (13,2 - 19,7 mm)	-	-	30	$3,3^{a}$	-	-
Muy grandes (> 19,8 mm)	-	-	-	-	-	-
B. por ambiente	n	P (%)	n	P (%)	n	P (%)
borde del Bañado	53	$5,7^{aA}$	135	0,0	32	$6,3^{A}$
canal ancho del Malezal	445	$9,7^{aA}$	873	$8,8^{aA}$	-	-
canal angosto del Malezal	12	0,0	51	$3,9^{a}$	-	-

n: Números de caracoles examinados; P: Prevalencia

Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05) dentro de cada estación

Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p< 0,05) entre estaciones.

Entre estaciones la prevalencia de los juveniles fue significativamente mayor en verano de 2004 que en otoño e invierno, mientras que la prevalencia de los medianos fue similar en otoño e invierno y significativamente mayor que en verano de 2004 (Tabla 6.6 A). La prevalencia por ambiente no mostró diferencias entre estaciones (Tabla 6.6 B).

En la Figura 6.5 se muestra el tamaño de los caracoles infectados en otoño, invierno y verano de 2004. El largo de la conchilla difirió significativamente entre estaciones ($H_{(2)}$= 8,0; p= 0,018). Las comparaciones de a pares mostraron que los caracoles infectados en invierno fueron más grandes que los infectados en otoño y verano de 2004 (Fig. 6.5).

Si sólo se analizan los caracoles infectados, en otoño y en invierno hubieron más medianos que juveniles infectados (Tabla 6.7 A). A su vez, en invierno hubieron más juveniles que grandes infectados. En verano de 2004 sólo se encontraron dos *L. columella* infectadas, una juvenil y la otra mediana. La proporción de juveniles y medianos infectados no difirió entre estaciones (Tabla 6.7 A). En otoño e invierno más del 90% de los caracoles infectados provino de los canales anchos del Malezal, siendo este porcentaje significativamente mayor que la de los otros ambientes (Tabla 6.7 B).

Figura 6.5: Tamaño de las *L. columella* infectadas en otoño, invierno y verano de 2004 del primer período húmedo. Gráfico de Cajas y bigotes (Box & Whisker plot). El círculo central representa la mediana, el borde superior e inferior de la caja el primer y el tercer cuartil, respectivamente y los bigotes los valores extremos (mínimo y máximo). Letras distintas indican diferencias significativas entre estaciones. n= número de caracoles infectados.

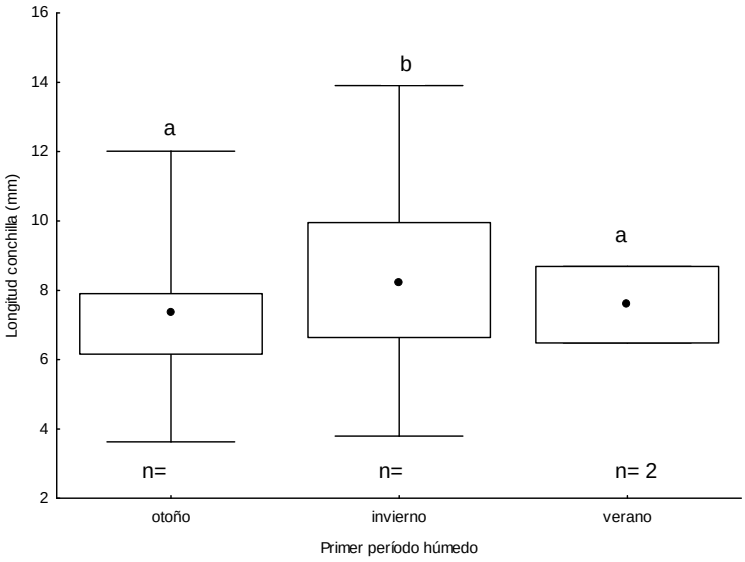


Tabla 6.7: Proporción de caracoles *L. columella* infectados por estación durante el primer período húmedo. **A.** proporción de caracoles infectados por tamaño de *L. columella*,**B.** proporción de caracoles infectados por ambiente

	Primer período húmedo		
Estación	otoño (n= 46)	invierno (n= 79)	verano 04´ (n= 2)
A. por clase de tamaño	%	%	%
Recién nacidos (1,1 - 3,5 mm)	-	-	-
Juveniles (3,6 - 6,5 mm)	$30,4^{aA}$	$22,8^{aA}$	$50,0^{aA}$
Medianos (6,6 - 13,1 mm)	$69,6^{bA}$	$75,9^{bA}$	$50,0^{aA}$
Grandes (13,2 - 19,7 mm)	-	$1,3^{c}$	-
Muy grandes (> 19,8 mm)	-	-	-
B. por ambiente	%	%	%
borde del Bañado	$6,5^{aA}$	-	$100,0^{B}$
canal ancho del Malezal	$93,5^{bA}$	$97,5^{aA}$	-
canal angosto del Malezal	-	$2,5^{b}$	-

n: Número de caracoles infectados; %: proporción de caracoles
Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05) dentro de cada estación
Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p< 0,05) entre estaciones

.

6.5.3. Dinámica de transmisión

En esta sección se muestran en forma integrada y resumida los resultados expuestos en este capítulo, los cuales permiten describir la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en el Departamento de Berón de Astrada. Para analizar la dinámica de transmisión se tuvieron en cuenta la prevalencia estacional de *F. hepatica* en el ganado bovino, la prevalencia estacional de *F. hepatica* en *L. columella*, la temperatura media y máxima del aire y los resultados del balance hídrico en relación a la disponibilidad de agua en el suelo.

En la Figura 6.6 se muestran los valores de estas variables en el primer período húmedo y en la Figura 6.7 en el período seco, de recarga y segundo período húmedo. Dado que el ganado bovino tiene libre acceso a todos los ambientes estudiados y que los caracoles pertenecen a una única población, la dinámica de transmisión se analizó sin tener en cuenta de que ambiente provenían los caracoles.

Figura 6.6: Dinámica de transmisión de *Fasciola hepatica* en el Departamento de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, durante el primer período húmedo. **A.** Prevalencia de infección en el ganado bovino por categoría etaria (blanco: terneros; gris: vaquillonas; negro: vacas), **B.** Prevalencia de infección en *Lymnaea columella*, **C**. Temperatura media (rombo) y máxima (guión) mensual del aire **D.** Balance hídrico (E: exceso de agua; U: utilización del agua del suelo; R: reposición del agua del suelo).

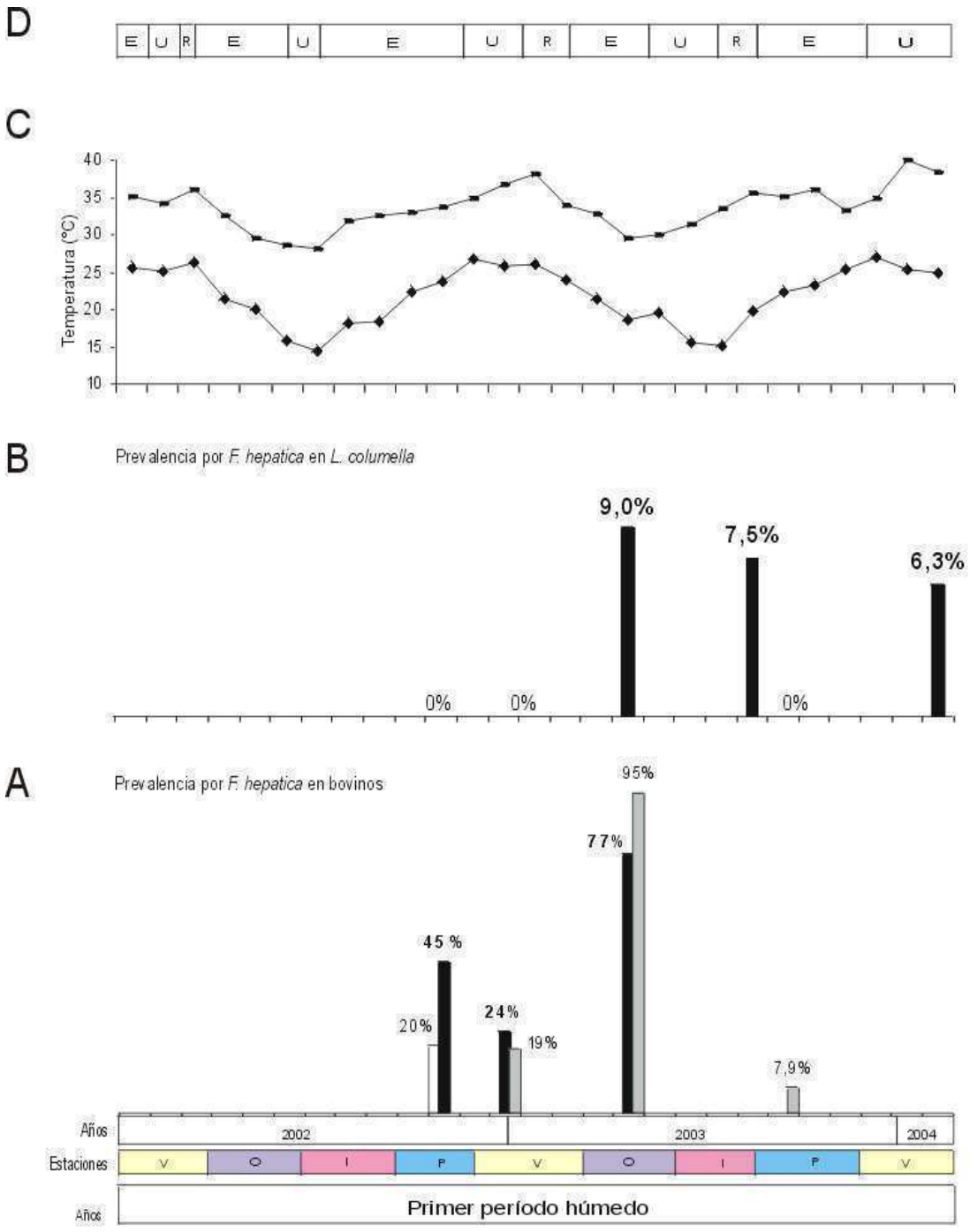
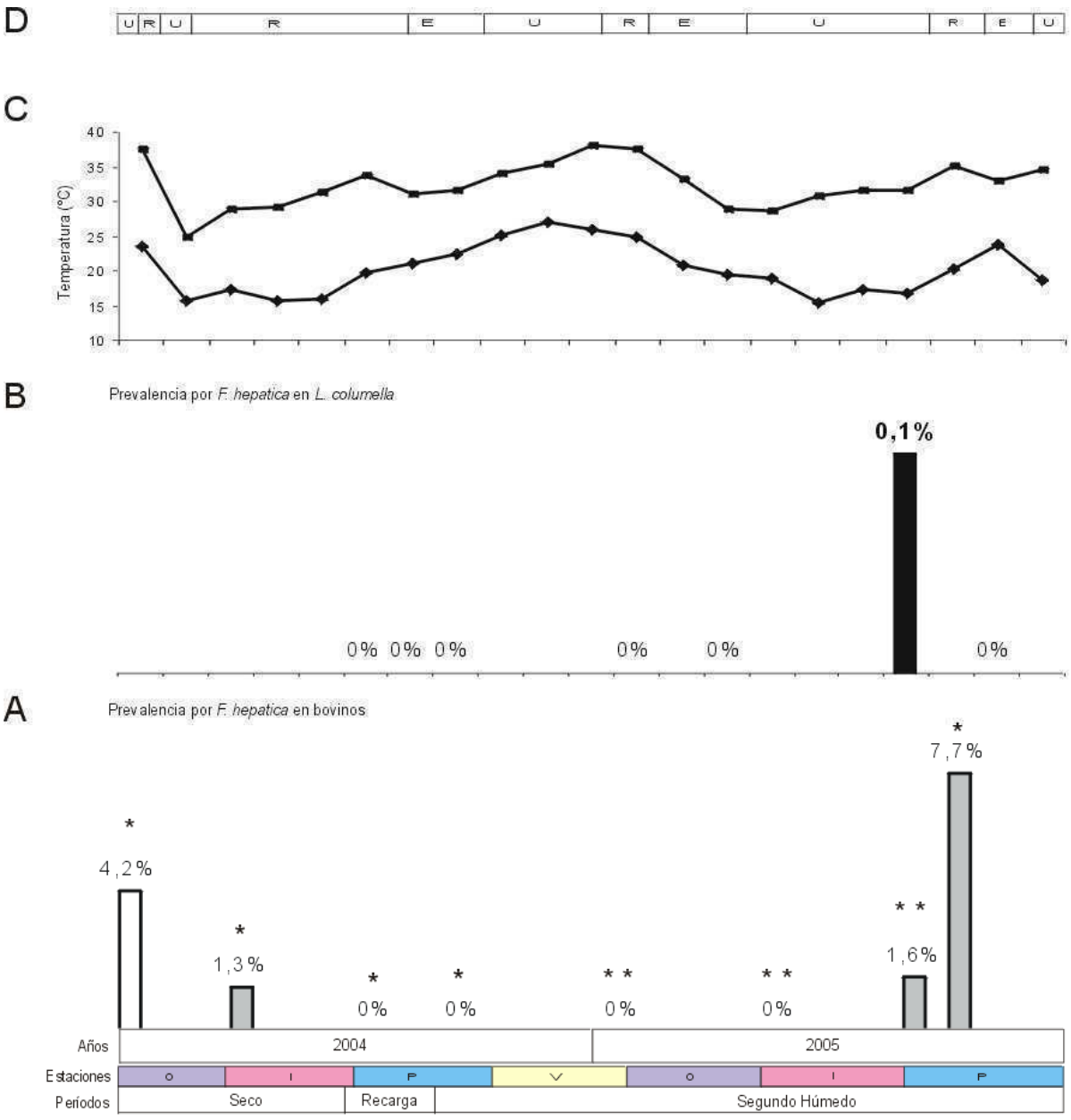


Figura 6.7: Dinámica de transmisión de *Fasciola hepatica* en el Departamento de Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, durante el período seco, el de recarga y el segundo período húmedo. **A.** Prevalencia de infección en el ganado bovino por categoría etaria y cohorte (blanco: terneros; gris: vaquillonas; *: primer cohorte; **: segunda cohorte), **B.** Prevalencia de infección en *Lymnaea columella*, **C**. Temperatura media (rombo) y máxima (guión) mensual del aire y **D.** Balance hídrico (E: exceso de agua; U: utilización del agua del suelo; R: reposición del agua del suelo).



6.6. Discusión

6.6.1. Generalidades

En el Departamento de Berón de Astrada se detectó un foco de transmisión de *Fasciola hepatica* bien establecido con altas prevalencias en el hospedador definitivo e intermediario. *Lymnaea columella* fue identificada como el único hospedador intermediario involucrado en la transmisión de esta zoonosis en la zona de estudio. Este hallazgo de infección natural por *F. hepatica* en *L. columella* constituye el primer registro para la Argentina. Hasta el presente trabajo *Lymnaea viatrix* era la única especie involucrada en la transmisión de *F. hepática* en la Provincia de Corrientes ya que en la década del 70´ se la había encontrado infectada en el Departamento de San Roque (Lombardero *et al.*, 1979a). En el resto de los Departamentos donde se detectó infección se desconoce que especie actúa como hospedador intermediario, ya que no se han llevado a cabo estudios epidemiológicos integrales y la prevalencia en el ganado bovino es calculada con datos de decomisos de hígados en mataderos municipales o nacionales (ver Capítulo 2, página 23).

En 1997 aparecieron repentinamente los primeros casos de infección por *F. hepatica* en el ganado bovino en el Departamento de Berón de Astrada, a pesar de que hacía 20 años que se realizaban estudios para evaluar esta parasitosis en la zona (Moriena *et al.*, 1999). En esa oportunidad no se identificó al hospedador intermediario y la identidad del caracol involucrado en la transmisión recién fue revelada en este trabajo. Sin embargo, el hecho de que en la actualidad *L. columella* sea la única especie de la familia Lymnaeidae hallada en Berón de Astrada permitiría suponer que en 1997 la situación era similar. Por lo tanto, la aparición de infección en bovinos podría estar asociada al ingreso de este caracol en la zona, proveniente probablemente del Departamento de Ituzaingó, por ser la zona más cercana con presencia de *L. columella* (Paraense, 2005). La gran capacidad de colonización y de adaptación a distintas condiciones climáticas de *L. columella* (DeKock et al., 1989), sumadas a la existencia de una gran variedad de ambientes dulceacuícolas aptos para el desarrollo de estos caracoles en el Departamento de Berón de Astrada, seguramente posibilitaron que esta especie se estableciera exitosamente y desarrollara poblaciones abundantes y estables. Posteriormente, el posible ingreso en la zona de ganado bovino infectado, producto del normal movimiento de la hacienda, y la eficiencia de *L. columella* como hospedador intermediario de *F. hepatica* (Harris y Charleston, 1976) pudieron haber posibilitado el establecimiento de los focos de transmisión que se observan en la actualidad.

Dado que la epidemiología de la fasciolosis varía en función de la región geográfica y de la especie de lymneido involucrada en la transmisión del parásito (Mas-Coma *et al.*, 2005), el estudio de la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en Berón de Astrada supuso

un doble desafío. Por un lado porque nunca se había estudiado la epidemiología de esta zoonosis en una región de Argentina con clima subtropical y por el otro, porque es la primera vez que se encuentra a *L. columella* como hospedador intermediario del parásito en Argentina.

6.6.2. Infección por *F. hepatica* en el ganado bovino

Durante el **primer período húmedo** el ganado bovino presentó infección por *F. hepatica* en cada oportunidad en que fue muestreado, independientemente a la estación del año. Durante este período los animales de las distintas categorías etarias fueron sometidos a tratamientos antiparasitarios aislados y sin un cronograma específico de aplicación, lo que generó distintas situaciones, como terneros que no habían recibido ningún tratamiento antiparasitario (primavera de 2002), vaquillonas que habían sido tratadas con Ivermectina, una droga que no tiene efectos sobre ningún estadio de *F. hepatica* (primavera de 2003) o vacas y vaquillonas que habían sido tratadas con Albendazol pero el lapso de tiempo transcurrido entre la aplicación y el muestreo era demasiado grande y la droga ya no tenía efecto. Por lo tanto, se considera que todos los individuos estudiados durante este período, independientemente de la categoría etaria, se encontraban en igualdad de condiciones en relación a la infección. De esto se desprende que las variaciones estacionales de la prevalencia no pueden ser atribuidas a los tratamientos sino a otros factores como a la disponibilidad de metacercarias en el ambiente, las condiciones climáticas, la presencia, la abundancia y la infección de los caracoles, entre otras.

Durante el primer período húmedo la prevalencia en las vacas fue similar a la de las vaquillonas y ambas fueron mayores que la de los terneros. Desde el punto de vista del comportamiento alimentario de los bovinos, es esperable encontrar mayor proporción de vacas y vaquillonas infectadas que de terneros. Los bovinos adultos invierten más de un tercio del día pastando (Pereyra y Leiras, 1991). Sí las vacas y las vaquillonas pastan en los mismos lugares y tienen acceso a los mismos ambientes las probabilidades de consumir metacercarias al alimentarse serían las mismas. Por lo tanto, sería esperable que estos dos grupos presenten niveles de infección similares. Por el contrario, el comportamiento alimentario de los terneros es completamente diferente ya que éstos se alimentan exclusivamente de leche materna durante los primeros meses de vida, y el pastoreo suele incorporarse paulatinamente y en forma intermitente (Pereyra y Leiras, 1991). Por lo tanto, es esperable también que los terneros estén menos infectados que las vacas y las vaquillonas. Resultados similares a los obtenidos en esta tesis fueron observados por Buchon *et al*. (1997) en la región norte del Altiplano boliviano, una zona altamente endémica

para la fasciolosis, donde la prevalencia por *F. hepatica* en terneros (8,1%) es considerablemente menor a la registrada en vaquillonas de 1 y 2 años (35,1%) y mayores a 2 años (29,2%). Al mismo tiempo, Gonzalez-Lanza *et al.* (1989) también muestran que la prevalencia en terneros es significativamente menor (< 5%) a la registrada en bovinos de entre 1 y 18 años (> 20%).

Por lo anteriormente expuesto, el nivel de infección de los terneros suele utilizarse como un indicador del nivel de contaminación de las pasturas con metacercarias de *F. hepatica*. En un área con una baja infestación de los pastos, no es esperable encontrar infecciones altas en terneros. En zonas con una gran contaminación de las pasturas, los pocos eventos de pastoreo que presentan los terneros alcanzarán para que estos ingieran metacercarias y se infecten. En este estudio, el hallazgo de un 20% de infección en terneros de tan sólo 4 meses de edad refleja una altísima contaminación de las pasturas al inicio del estudio. Este hecho es confirmado también por la prevalencia registrada en las vacas (n= 51, 45%), la cual supera ampliamente los niveles informados por la oficina de estadísticas del SENASA para la Provincia de Corrientes (2002: 2,4%) y por la dirección de Ganadería de la Provincia de Corrientes para la zona de Berón de Astrada (2,6%) (Moriena *et al.*, 1999).

Durante (período seco) **y después de la sequía** (período de recarga y segundo período húmedo) los niveles de infección por *F. hepatica* fueron bajos y hubo muestreos donde no se registró infección. En el caso de la *primera cohorte,* a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas entre la prevalencia en otoño (4,2%) y en invierno (1,3%) del período seco, en el período de recarga (0%) y en la primavera de 2004 del 2ºPH (0%), se observó una tendencia a la disminución de la prevalencia. Esta situación podría deberse a la combinación de dos factores: la aplicación regular de antihelmínticos y la posible falta de re-infección. Esta cohorte fue sometida a un programa de desparasitación estricto con aplicaciones de Albendazol al destete y cada 2 meses. Como se mencionó en el capítulo 3, esta droga es efectiva contra las *Fasciola* adultas pero no contra los juveniles que continúan migrando y desarrollándose. Al aplicar la droga cada 2 meses se logra eliminar a los nuevos adultos, que eran juveniles durante la aplicación anterior. De esta manera, si no hay re-infecciones es posible eliminar a todos los parásitos. La disminución de la prevalencia al 0% estaría indicando que los animales de esta primera cohorte no se estaban reinfectando lo cual refleja una considerable disminución en la oferta de metacercarias viables en el establecimiento. Esta disminución seguramente estuvo relacionada con las altas temperaturas y el déficit de agua registrados durante el período seco, condiciones bajo las cuales las metacercarias son destruidas completamente (Boray, 1969). Asimismo, el hecho

de que no se observe un aumento en la prevalencia cuando mejoraron las condiciones ambientales (período de recarga y comienzos del segundo período húmedo), estaría indicando que el ciclo de transmisión se habría interrumpido. Este tema se discute ampliamente en la sección 6.6.4. El hecho de que los terneros, que se infectaron antes de que comenzara la sequía porque nacieron en primavera de 2003, estuvieran más infectados que las vaquillonas confirmaría la disminución en la oferta de metacercarias, ya que como se mencionó más arriba, en función del comportamiento alimentario de los bovinos, en un ambiente contaminado sería esperable lo opuesto.

En la primavera de 2005 los animales de esta cohorte volvieron del establecimiento en Itá Ibaté con una prevalencia por *F. hepatica* de 7,7%. Este resultado muestra que dicho establecimiento no estaba libre de *F. hepatica* como suponían los productores, con lo cual sería recomendable analizar a los animales antes de que ingresen nuevamente al establecimiento “Don Ricardo” para evitar introducir más parásitos al ambiente o que se establezca nuevamente y se reinstale la transmisión.

En la *segunda cohorte* se observa una situación inversa respecto de la primera cohorte, ya que la prevalencia comienza a subir lentamente. Esta cohorte fue muestreada íntegramente después de la sequía, durante el segundo período húmedo cuando las condiciones ambientales ya estaban reestablecidas y los ambientes tenían agua, había suficiente humedad y la temperatura era la esperable para la zona. Sin embargo, el hecho de que ni los terneros ni las vaquillonas estaban infectados en verano y en invierno, respectivamente, indicaría que el nivel de contaminación del establecimiento probablemente era menor que durante el período seco, cuando la prevalencia en terneros era de 4,2% y en vaquillonas de 1,3% y seguramente, bastante menor que durante el primer período húmedo cuando la prevalencia en terneros era de 20% y en vaquillonas entre el 8% y el 95% (Tabla 6.4). Nuevamente estos resultados reflejarían la ausencia de metacercarias en el ambiente. En invierno las vaquillonas recibieron una dosis de Albendazol que fue innecesaria ya que estos animales no estaban infectados. El hallazgo de un 1,7% de infección en estas vaquillonas 2 meses después, a principios de primavera de 2005 del segundo período húmedo, sugeriría que el ciclo de transmisión se fue reestableciendo lentamente en el establecimiento y como se explica a continuación, el ganado ovino podría estar involucrado en esta situación.

El número de huevos hallados por gramo de materia fecal **(hpg)** fue bajo durante todo el período de estudio (<1). En el caso de *F. hepatica* no se puede establecer una relación

directa entre el hpg y la carga parasitaria (Malone y Craig, 1990). Sin embargo, sí se puede afirmar que estos animales liberan poca cantidad de huevos al ambiente. Entonces ¿cómo se explica que el ciclo de transmisión se halla establecido y mantenido exitosamente? Una posible explicación sería que con esa cantidad de huevos alcance para mantener el ciclo de transmisión a lo largo del tiempo, ya que éste parásito posee una gran capacidad de multiplicación asexual en el caracol hospedador intermediario, observándose que por cada miracidio que penetra pueden emerger entre 800 y 4000 cercarias (Ollerenshaw, 1971a). Estudios realizados en establecimientos donde sólo se cría ganado bovino mostraron prevalencias similares a las registradas en este estudio (≈50%) pero con valores de hpg muchísimo más elevados (3,3-65,8) (Gonzalez-Lanza *et al.*, 1989; Kleiman *et al.*, 2007), indicando que el número de huevos eliminados debe ser mayor al encontrado en este estudio para mantener el ciclo de transmisión.

La explicación más razonable es pensar que existen en el establecimiento otros hospedadores definitivos, domésticos y/o silvestres, que aportan huevos al ambiente (Cringoli *et al.*, 2006). Las ovejas son más susceptibles a la infección por *F. hepatica* y no desarrollan resistencia y tanto la prevalencia como el hpg suelen ser mayores que en los bovinos (Boray, 1993). Un estudio preliminar sobre la prevalencia de *F. hepatica* en los ovinos del establecimiento donde se realizó este estudio, reveló una prevalencia del 55,5% (n= 27) y una mediana de hpg de 9,0 (C_1-C_3= 1-24,3) durante el primer período húmedo (Issia *et al.*, 2005). El nivel de infección en los ovinos fue similar al observado durante el primer período húmedo en las vacas pero el hpg resultó 9 veces mayor. Estos resultados indicarían que durante el primer período húmedo las ovejas contribuyeron en gran medida a la contaminación de las pasturas e incrementaron el nivel de transmisión (Issia *et al.*, 2005). A pesar de que no fue posible muestrear al ganado ovino durante y después de la sequía, la disminución en la prevalencia y el hpg de los bovinos permite suponer que este tipo de ganado también sufrió una disminución en su nivel de infección, aunque probablemente sin llegar al 0% debido a que estos animales no reciben tratamientos antiparasitarios y a que las Fasciolas adultas pueden vivir hasta 8 años (Andrews, 1999). Seguramente el nivel mínimo de infección remanente en las ovejas no alcanzó para que el ciclo continúe, observándose la interrupción del mismo, aun cuando se habían restaurado las condiciones climáticas.

Estos resultados resaltan la importancia epidemiológica de cada tipo de ganado a la hora de implementar medidas de control tendientes a reducir los niveles de infección. En gran parte de Argentina, el ganado ovino no es incluido en los tratamientos antiparasitarios a los que son sometidos los bovinos, ya que se crían a pequeña escala y su destino final es el consumo interno. Esta práctica impide el control sobre la constante contaminación de las pasturas por parte de este tipo de ganado, que presenta infecciones crónicas y es capaz de

eliminar alrededor de 2 millones de huevos por animal por día (Boray, 1985). Para intentar controlar esta parasitosis y mantener lo más bajo posible los niveles de infección es recomendable incluir a las ovejas en los tratamientos antihelmínticos que regularmente se aplican en el establecimiento.

6.6.3. Infección por *F. hepatica* en *Lymnaea columella*

En este trabajo se utilizó la técnica de microscopía para detectar infección en *L. columella* y se identificó a *F. hepatica* a partir de la morfología de las cercarias, por considerar que estas técnicas son las más apropiadas para detectar infección en caracoles provenientes del campo. La observación de que las cercarias identificadas morfológicamente como *F. hepatica* se enquistaron sobre distintas superficies permitió ratificar su identidad, ya que las pocas especies de trematodes que presentan metacercarias con este comportamiento, poseen una morfología muy distinta a la de *F. hepatica* (Fried, 1997). La identidad de estas cercarias también pudo ser confirmada por PCR (Cucher *et al.*, 2006) y por la obtención de adultos de *F. hepatica* en las ratas infectadas experimentalmente.

La determinación de la infección por microscopía y morfología posee ciertas ventajas frente a otras técnicas más modernas como las de PCR, ya que permiten identificar distintos estadios larvales, reconocer infecciones exitosas a partir del hallazgo de cercarias maduras que se enquistan correctamente, cuantificar la cantidad de individuos de cada estadio larval y calcular la intensidad de infección junto con la prevalencia (Caron *et al*., 2008). Sin embargo, con estas técnicas no se detectan infecciones muy recientes y en el caso de *F. hepatica*, no se pueden identificar morfológicamente los estadios de redia y esporoquiste, porque poseen caracteres morfológicos similares a otras especies de trematodes. Por lo tanto, el cálculo de la prevalencia a partir de las cercarias maduras únicamente subestima el valor real. Por su parte, las técnicas de PCR pueden detectar la infección apenas ingresa el miracidio al caracol pero no brindan información sobre la intensidad de infección o sobre qué estadios larvales están presentes (Caron *et al*., 2008). Tampoco permiten determinar la viabilidad de los parásitos para discriminar entre infecciones exitosas o abortadas (Caron *et al*., 2008).

En el presente estudio la prevalencia por *F. hepatica* calculada a partir del número de *L. columella* infectadas sólo con cercarias maduras subestimó la prevalencia real, ya que las redias halladas en *L. columella* también fueron identificadas como *F. hepatica* por PCR. Al incluir estos caracoles la prevalencia general se elevó de 2,1% a 2,6%.

Llamativamente, por la técnica de PCR utilizada en este estudio se detectó un 41% de caracoles falsos negativos, es decir caracoles sin infección (negativos) según la técnica de microscopía e infectados (positivos) según la técnica molecular (Cucher *et al.*, 2006). Esta diferencia plantea ciertas dudas sobre los resultados de la técnica de PCR basada en la secuencia del gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa de *F. hepatica*. La gran cantidad de falsos negativos podría deberse a que dada la gran sensibilidad de la técnica de PCR utilizada, se podrían estar detectando infecciones muy recientes o finalizadas recientemente o que no llegaron a establecerse y prosperar (infecciones abortadas) (Cucher *et al*., 2006). Por lo tanto, dado que la técnica de microscopía/morfología permite detectar en forma patente al parásito y determinar el éxito de la infección y la técnica de PCR permite corroborar la identidad de las cercarias y detectar los estadios larvales inmaduros (esporoquiste y redia), ambas técnicas deberían aplicarse a los mismos caracoles y actuar como control de la otra, para obtener un resultado más confiable y real sobre el nivel de infección en el hospedador intermediario.

La prevalencia de infección natural por *F. hepatica* registrada en *L. columella* durante todo el período de estudio fue de 2,1% considerando sólo a los caracoles infectados con cercarias maduras del parásito (n= 128). Este nivel de infección es similar al registrado en *L. truncatula* en la Provincia de Mendoza (Issia *et al.*, 2008) y en *L. viatrix* en la Provincia de Neuquén (Rubel *et al*., 2005) y mayor al registrado en *L. viatrix* en los valles andino Patagónicos de la Provincia de Chubut (0,7%; Kleiman *et al.*, 2007). Estos valores están dentro del rango de variabilidad que presenta la prevalencia de infección natural por *F. hepatica* en su hospedador intermediario, que oscila entre 0,01% y 88,3% (Malone *et al.*, 1984), no sólo entre especies de caracoles (Boray *et al.*, 1984) sino para una misma especie entre regiones (Gutiérrez *et al.*, 2005). Esta variabilidad también refleja la dificultad para comparar el rol o la importancia de las distintas especies de lymneidos en la transmisión de *F. hepatica*. Lo que sí es posible afirmar es que con bajas prevalencias en el caracol se observan prevalencias altas en el hospedador definitivo (>50%) (Kleiman *et al*., 2007; Rubel *et al.*, 2005), lo cual refleja la eficiencia en la transmisión de *F. hepatica*.

La prevalencia registrada durante el período de estudio de esta tesis fue muy variable ya que hubo muestreos donde no se registró infección, otros donde el nivel de infección fue muy bajo (0,1%) y otros donde la prevalencia osciló entre 6,3% y 9%. Estos últimos valores pueden considerarse altos ya que no sólo resultaron mayores a los registrados en las otras especies de lymneidos de Argentina, sino que también son mayores a los registrados en *L. columella* en los siguientes estados de Brasil, donde actúa como el hospedador intermediario principal en la transmisión de *F. hepatica*: Minas Gerais (5,2% y 3,9%, Coelho

y Lima, 2003); Río de Janeiro (2,4%, Rezende *et al.*, 1973); São Paulo (1,22% y 0,14%, (Ueta, 1980a); 5,26%, Oliveira *et al.*, 2002) y Río Grande do Sul (3,3%, Silva Santos *et al.*, 1987). Esta comparación permite concluir que en Berón de Astrada, *L. columella* es un muy buen hospedador intermediario, capaz de transmitir al parásito exitosamente y asegurar la endemicidad de la infección.

Durante el estudio sólo se encontraron *L. columella* infectadas en los períodos húmedos, lo cual indica que la presencia constante de agua, más allá de las fluctuaciones estacionales, resultó imprescindible para la continuidad del ciclo de transmisión. Mas aun, que la prevalencia durante el primer período húmedo haya sido mayor a la del segundo período húmedo refleja la influencia negativa del período seco en la transmisión del parásito. En el capítulo 5 se mencionó la capacidad de *L. columella* para estivar durante la sequía y cómo la población pudo resurgir cuando las condiciones ambientales volvieron a ser favorables. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con *F. hepatica* ya que los caracoles que entraron en la estivación presentaban un 6,3% de infección (verano de 2004 del 1ºPH) y los que emergieron 6 meses después, no estaban infectados (invierno del período de recarga). La muerte de los caracoles infectados durante la estivación podría deberse a que éstos son más dependientes de las condiciones acuáticas y toleran menos las condiciones de sequía (Rondelaud y Vincent, 1974), o a que son más susceptibles a cambios en las condiciones ambientales en comparación con los caracoles sanos (Roberts y Suhardono, 1996), o a que bajo estas condiciones de stress son incapaces de compensar la pérdida de glucógeno provocada por las cercarias y por lo tanto tienen menos posibilidades de sobrevivir (Graczyk y Fried, 1999). La respuesta a estas observaciones sólo puede ser contestada en un marco experimental, diseñando experimentos con *L. columella* sanas e infectadas y evaluando su respuesta a diferentes situaciones de stress ambiental. Pero sea cual fuera la razón por la cual los caracoles infectados no sobrevivieron a la sequía, lo importante es que ante un evento de stress ambiental severo como una sequía continua de 6 meses, la dinámica de transmisión de *F. hepatica* se vió afectada seriamente. Este tema se discutirá más detalladamente en la sección 6.6.4.

Dentro del primer período húmedo la prevalencia estacional por *F. hepatica* no estuvo relacionada con la abundancia de *L.* columella en cada muestreo, indicando que la cantidad de caracoles disponibles no afectaría la transmisión, ya que con unos pocos individuos presentes, como ocurrió en verano de 2004 (n=32) alcanzaría para que el ciclo se desarrolle exitosamente. Resultados similares fueron observados en *L. columella* en Nueva Zelanda (Harris y Charleston, 1976) y en *L. tomentosa* en Australia (Boray, 1964). Sin embargo, sí se

encontró una relación inversa entre la abundancia y la prevalencia de *L. columella* cuando se consideraron todos los muestreos juntos en cada período húmedo. En el 1ºPH la abundancia de *L. columella* fue significativamente menor que en el 2ºPH y la prevalencia fue significativamente mayor (Tabla 6.5). Resultados similares fueron observados por Lafferty (1993) y Puurtinen *et al* (2004), quienes sugieren que una asociación negativa entre la abundancia y la infección podría deberse al efecto de castración que tiene el parásito sobre su hospedador, impidiendo que este se reproduzca normalmente y provocando una disminución en la incorporación de nuevos individuos a la población. Otros autores adjudican esta asociación negativa a que la infección por trematodes incrementa la mortalidad natural de los caracoles (Sorensen y Minchella, 1998), reduciendo considerablemente la abundancia poblacional. En el caso particular del sistema hospedador-parásito integrado por *L. columella-F. hepatica,* diversos estudios experimentales han mostrado que efectivamente las *L. columella* infectadas poseen mayor mortalidad y menor fecundidad que los caracoles sanos (Boray *et al.*, 1984; León-Dancel, 1970; Salazar *et al.*, 2006; Ueta, 1980b).

Durante el 1º PH la prevalencia por *F. hepatica* aumentó con el tamaño de *L. columella* entre las categorías de recién nacidos (0%), juveniles (5,2%) y medianos (10%). Esto podría deberse a un aumento en el tiempo de exposición a los miracidios de *F. hepatica* a medida que los caracoles son más grandes, incrementando así las probabilidades de contraer la infección (Woolhouse, 1989). Si bien la relación entre el tamaño y la edad de los caracoles es difícil de determinar en poblaciones naturales sujetas a cambios ambientales continuos (Woolhouse y Chandiwana, 1989), se puede asumir que los caracoles grandes son más viejos, en promedio, que los caracoles pequeños (Minchella *et al*., 1985). Esto implica que los caracoles más grandes tuvieron mayor tiempo de exposición al parásito y por lo tanto explicaría el aumento de la prevalencia con el tamaño de los caracoles (Graham, 2003; Manga-Gonzalez *et al.*, 1991; Sorensen y Minchella, 2001; Woolhouse, 1989). Otra explicación podría ser que en los caracoles juveniles y medianos transcurrió el tiempo suficiente para observar la presencia de cercarias maduras en el hepatopáncreas del caracol, lo cual sucede entre las 4 y 7 semanas después del ingreso del miracidio (Andrews, 1999). Dado que *L. columella* es susceptible de infectarse con *F. hepatica* apenas eclosiona (Coelho *et al*., 2008), la falta de infección entre las *L. columella* recién nacidas podría deberse a que el tiempo de exposición al parásito no fue el suficiente para contraer la infección o, que en caso de estar infectadas, que no haya transcurrido el tiempo necesario para observar cercarias maduras.

Esta misma explicación serviría para explicar porqué entre los caracoles infectados la mayoría eran medianos (>50%, Tabla 6.6 A).

La disminución de la prevalencia por *F. hepatica* entre las *L. columella* grandes (3,5%, Fig. 6.3) podría deberse, entre otras cosas, a que éstos caracoles poseen un mejor sistema de defensa que impediría el desarrollo del parásito (Riley y Chappell, 1992). Aunque también podría deberse a: **1)** que la mortalidad natural de *L. columella* aumenta con su tamaño (Gutiérrez *et al*., 2001): La estructura poblacional de *L. columella*, analizada detalladamente en el capítulo 5, mostró que a lo largo de todo el período de estudio (con la excepción del muestreo de invierno del 2ºPH) la pro porción de caracoles grandes fue baja (0%-18,1%), y en cada estación fue menor a la de caracoles medianos (Figura 5.10). Estos resultados estarían indicando que entre los caracoles medianos y grandes aumentaría considerablemente la mortalidad, sugiriendo que estos últimos comienzan a ser senescentes y mueren. Por lo tanto, al disminuir la abundancia de los caracoles grandes, disminuye también la probabilidad de encontrar alguno de ellos infectados; y **2)** a que la infección por trematodes incrementa la mortalidad natural de los caracoles (Sorensen y Minchella, 1998): En ambos períodos húmedos se encontró una relación inversa entre la prevalencia de infección y el tamaño alcanzado por *L. columella* (ver Tabla 6.5). En el 1ºPH la gran prevalencia por *F. hepatica* (7,24%) podría explicar el menor tamaño alcanzado por la población de *L. columella*, ya que los caracoles infectados poseen mayores tasas de mortalidad y esta sería más evidente entre los caracoles grandes porque se sumaría a la alta tasa de mortalidad natural. La relación inversa entre éstas variables podría explicarse también porque los caracoles infectados poseen menores tasas de crecimiento (Salazar *et al.*, 2006) y por lo tanto no llegarían a alcanzar tamaños grandes ni muy grandes.
Cuando la población no está infectada, como ocurrió en el 2ºPH (0,1%), los caracoles alcanzarían tamaños mayores llegando sin dificultad a los tamaños englobados en la categoría de “grandes” y “muy grandes”.

Resulta interesante destacar el hecho de que en este trabajo se encontraron *L. columella* infectadas tanto inmaduras (juveniles) como maduras sexualmente (medianas y grandes), en contraposición a lo observado en *L. viatrix* donde siempre los caracoles infectados fueron adultos (Kleiman *et al*., 2007; Rubel *et al*., 2005). La importancia de los caracoles grandes en la transmisión de *F. hepatica* ha sido discutida por (Ollerenshaw, 1971b) quién encontró que las *L. truncatula* maduras representaban el 85% de los caracoles infectados y a su vez, contenían hasta 10 veces más redias que los caracoles inmaduros. Sin embargo, el hecho de que *L. columella* también pueda infectarse y alcanzar prevalencias

altas en sus estadios inmaduros potencia su rol como hospedador intermediario, ya que aumenta considerablemente la población susceptible, incrementando la transmisión de *F. hepatica*.

La gran prevalencia de infección registrada en las *L. columella* medianas permite afirmar que esta categoría de tamaño juega un rol fundamental en la transmisión de *F. hepatica*, la cual se suma a la importancia que tiene este tamaño en su propia dinámica poblacional. En el capítulo 5 se mencionó la capacidad de las *L. columella* medianas para tolerar períodos prolongados de stress ambiental, como la sequía de 6 meses observada en este estudio y como fueron las que mejor soportaron esta situación desfavorable y al resurgir de la estivación, cuando las condiciones climáticas mejoraron, fueron capaces de reproducirse inmediatamente, asegurando una recuperación rápida y efectiva de la población. Su rol en la dinámica de transmisión de *F. hepatica* también fue fundamental ya que fueron la clase de tamaño con mayor prevalencia. Esto se debe a que fueron los caracoles con mayor tiempo de exposición al parásito y por lo tanto con mayores chances de infectarse y a que por ser "jóvenes" estuvieron en condiciones de soportar la infección y desarrollarla exitosamente.

Durante el primer período húmedo también se encontraron diferencias en la prevalencia y en la proporción de las *L. columella* infectadas entre los ambientes estudiados (borde del Bañado, canales anchos y angostos del Malezal). En verano de 2004 sólo se encontraron caracoles en el borde del Bañado por lo que la comparación entre ambientes se realizó únicamente en otoño e invierno. El canal ancho del Malezal fue el único ambiente que presentó infección en ambos muestreos y su prevalencia fue levemente mayor a la registrada en los otros ambientes, a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6.5-B). A su vez, más del 90% de los caracoles infectados en cada muestreo provino de este ambiente (Tabla 6.6-B). Estos resultados muestran que el canal ancho del Malezal juega un rol fundamental en la transmisión de *F. hepatica* y se diferencia claramente de los otros dos ambientes. Esto podría deberse por un lado, a una preferencia alimentaria del ganado bovino por la vegetación que crece sobre los montículos que conforman el Malezal (Pizzio *et al.*, 1994), a la cual acceden por los canales anchos, por lo que el ganado permanecería más tiempo en este ambiente que en el borde del Bañado, donde predomina la vegetación acuática que no es comúnmente elegida por el ganado vacuno. A su vez, los canales anchos (20-50cm), a diferencia de los angostos (< 20cm), constituyen dentro del Malezal sitios más accesibles para que el ganado pueda beber agua cómodamente, lo cual aumenta la permanencia de los animales y las chances de que defequen y liberen huevos de *F. hepatica* allí. La evidencia de que el ganado busca

ambientes con agua se observa en el verano de 2004 cuando sólo se encuentran caracoles infectados en el borde del Bañado que era el único ambiente que no estaba seco.
Por lo tanto, en los canales anchos del Malezal la combinación de una gran cantidad de caracoles (como se mencionó en el capítulo 5) y una gran concentración de ganado bovino atraído por la vegetación de los montículos y por el fácil acceso al agua, facilitaría el encuentro entre los hospedadores y el parásito favoreciendo la transmisión de *F. hepatica*. En cambio, en el borde del Bañado no parece favorecerse la transmisión, seguramente porque si el ganado tiene otras zonas donde pastorear, no suele dirigirse a este ambiente. Sin embargo, el borde del Bañado tendría una importancia indirecta en la transmisión del parásito, relacionada con su rol como fuente de *L. columella*, como se mencionó en el capítulo 5. El borde del bañado fue el último ambiente en secarse cuando comenzó la sequía y el primero en retener agua cuando aumentaron las precipitaciones, constituyendo muy probablemente, el lugar donde las *L. columella* se enterraron para estivar y esperar que mejoren las condiciones ambientales (Capítulo 5). Una vez restauradas las condiciones climáticas los caracoles lograron dispersarse desde el Bañado hacia el resto de los ambientes.

6.6.4. Dinámica de transmisión

La dinámica de transmisión de *F. hepatica* está íntimamente relacionada con factores climáticos, como la temperatura y la humedad (Malone *et al.*, 1984; Manga *et al.*, 1990; Ollerenshaw, 1971b) y el efecto de cada una de estas variables cambia según el clima predominante en cada zona. En aquellas áreas donde la temperatura media del aire oscila entre 10ºC y 30ºC la transmisión se produce durante todo el año si hay humedad disponible en el terreno. En zonas sujetas a inviernos rigurosos, veranos muy cálidos o períodos de sequía, la transmisión está restringida a los meses más favorables (Torgerson y Claxton, 1999). En el norte de la Provincia de Corrientes la dinámica de transmisión de *F. hepatica* estuvo influenciada principalmente por la disponibilidad de agua y, en segunda instancia, por la temperatura.

Durante el **primer período húmedo (1ºPH)** el agua o la humedad no fue un factor limitante en la transmisión de *F. hepatica* ya que todos los ambientes tuvieron la mínima cantidad de agua necesaria para que se desarrollen los caracoles y los estadios de vida libre del parásito. Al mismo tiempo, la temperatura media mensual del aire tampoco fue un factor limitante ya que fluctuó entre 14,3ºC y 27ºC (Fig. 6.6 C), estando ambos valores incluidos en el rango en el cual el ciclo de *F. hepatica* se desarrolla exitosamente y la transmisión se

produce todo el año (Torgerson y Claxton, 1999). En efecto, durante este primer período húmedo, la transmisión de *F. hepatica* podría considerarse continua ya que se encontró ganado bovino infectado en primavera de 2002, verano, otoño y primavera de 2003 y *L. columella* infectadas en otoño, invierno y verano (Fig. 6.6 A,B). Estos resultados reflejarían que durante este período se produjo seguramente una liberación constante de huevos de *F. hepatica* al ambiente, los cuales encontraron condiciones favorables de humedad y de temperatura para su desarrollo y la eclosión de los miracidios. Al mismo tiempo, estas mismas condiciones ambientales favorecieron la presencia de una población muy abundante de *L. columella*, susceptible a infectarse y a desarrollar exitosamente la infección. A su vez, las metacercarias producidas por los caracoles seguramente se mantuvieron viables a lo largo de todo el 1º PH, aumentando la probabilidad del ganado de infectarse continuamente. En el sudeste de Brasil se observó un patrón de transmisión similar al registrado en esta tesis, con disponibilidad de metacercarias durante todo el año, pero principalmente entre otoño e invierno (Amato *et al.*, 1986; Faria *et al.*, 2005).

Sin embargo, más allá de esta aparente continuidad en la transmisión, tanto en el hospedador definitivo como en el intermediario se observaron variaciones estacionales de la prevalencia que reflejarían la influencia del nivel de agua (Fig. 6.6 D) y de la temperatura máxima mensual del aire (Fig. 6.6 C) en la transmisión de *F. hepatica*.
Por ejemplo, el ganado bovino estaba muy infectado en la primavera de 2002 y sin embargo no se encontraron caracoles infectados en el verano siguiente (2003). Esta falta de infección en *L. columella* podría deberse, por un lado a que había muy pocos caracoles durante esta estación (n= 2; Figura 5.4) lo cual disminuye la probabilidad de encontrar alguno infectado, y por el otro, a que las altas temperaturas máximas registradas durante ese verano (enero: 36,6 ºC; febrero: 38,1 ºC) podrían haber inhibido el desarrollo de los huevos de *F. hepatica* en el ambiente (Andrews, 1999), disminuyendo el número de miracidios capaces de infectar a los caracoles. En el verano también se observó una disminución en la prevalencia de las vacas y las vaquillonas, que nuevamente estaría relacionada con la temperatura máxima, ya que la supervivencia e infectividad de las metacercarias disminuye al aumentar la temperatura y son destruidas rápidamente por el calor y la sequía, condiciones predominantes en los meses de verano (Boray, 1969). En Berón de Astrada, en el verano de 2003 no se registraron sequías y el balance hídrico mostró utilización y reposición del agua del suelo (Fig. 6.6 D), situación que se vió reflejada también en el campo ya que los ambientes tenían una columna de agua media de entre 12 y 23,7 cm (Tabla 5.1). Esto indicaría que, probablemente, las metacercarias adheridas a los pastos murieron o perdieron

su infectividad debido a las altas temperaturas registradas en ese verano y al no haber caracoles infectados, no hubo aporte de nuevas metacercarias.

El hecho de que en otoño se registró la mayor prevalencia en el ganado (77% en vacas y 95% en vaquillonas) y que en otoño e invierno se alcanzaron las mayores prevalencias en *L. columella* (9,0% y 7,5%, respectivamente) (Fig 6.6), reflejaría que durante estas estaciones se produce la mayor transmisión de *F. hepatica* en la zona de estudio. Esto se debe a que durante estas estaciones ni la temperatura máxima del aire ni el nivel de agua fueron limitantes para el normal desarrollo de los estadios de vida de libre del parásito y de los caracoles.

En la primavera de 2003, llamativamente la prevalencia en *L. columella* y en el ganado fueron significativamente menores a lo esperado (0% y 7,9%, respectivamente). Con respecto al caracol era esperable encontrar un nivel de infección al menos semejante al observado en invierno, ya que el ganado estaba muy infectado, había exceso de agua y la temperatura era adecuada para el desarrollo de los huevos y los miracidios (Fig. 6.6). Para el ganado, también era esperable un nivel de infección alto ya que la elevada infección en *L. columella* en invierno implicaba una gran contaminación de las pasturas con metacercarias infectivas. La situación observada podría explicarse por el nivel de agua registrado durante la primavera de 2003. El balance hídrico mostró exceso de agua durante toda la estación (Fig. 6.6 D), la columna de agua media osciló entre 18,3 y 19,5 cm (Tabla 5.1) y todos los ambientes estaban desbordados e interconectados entre sí. Esto provocó por un lado la dispersión de *L. columella* hacia otros sitios, lo cual se reflejó en una disminución de su abundancia como se mencionó en el capítulo 5 (Fig. 5.4), y por el otro lado, podría haber provocado también la dispersión y la consecuente dilución de las metacercarias, disminuyendo la probabilidad de encuentro y la infección del ganado. A su vez, el ganado Braford, que es reacio a alimentarse en ambientes inundados o muy profundos (Racioppi, com pers), seguramente evitó los ambientes donde estaban los caracoles, impidiendo la continuidad de la transmisión al no haber contacto entre hospedadores y ni entre estos y el parásito.

En verano de 2004, a diferencia de la primavera de 2003, la disminución del nivel de agua explicaría la aparición de un 6,3% de infección en *L. columella* (Fig. 6.6). Durante este verano, si bien las temperaturas máximas fueron tan elevadas como en el verano anterior (enero: 34,9ºC; febrero: 40ºC) y los huevos podrían haberse destruido por el calor (Andrews, 1999), la falta de agua concentró a los caracoles en el borde del Bañado, único ambiente que aún contenía agua y seguramente obligó al ganado a acercarse para beber. El ganado habría eliminado los huevos de *F. hepatica* en el sitio donde estaban los caracoles,

facilitando la infección. Situaciones similares fueron observadas en países tropicales donde en los períodos de sequía se incrementa la transmisión (Morales y Morales, 2004).

Las *L. columella* del verano de 2004 fueron las últimas halladas con vida antes de la sequía de 6 meses que tuvo lugar entre otoño y fines de invierno del 2004.

La dinámica de transmisión durante el **período seco, el de recarga y el segundo período húmedo** fue completamente distinta a la del primer período húmedo. Durante el **período seco** no se encontraron caracoles vivos (Fig. 6.7 B) y la prevalencia en el ganado (Fig. 6.7 A) fue significativamente menor que durante el 1ºPH. Durante el **período de recarga** las *L. columella* que habrían emergido de la estivación (invierno) no estaban infectadas, como tampoco la población nueva que se estableció rápidamente a principios de primavera de 2004 (Fig. 6.7 B). En este mismo período, la prevalencia en el ganado siguió disminuyendo y alcanzó 0% a principios de la primavera (Fig. 6.7 A). Esta situación podría deberse a que probablemente el ganado no se reinfectó porque no habría metacercarias en el ambiente, ya que las producidas con anterioridad a la sequía seguramente murieron durante el período seco por desecación y calor (Andrews, 1999) y porque al no haber caracoles infectados durante el período de recarga, no hubo liberación de metacercarias nuevas al ambiente. Durante el período seco seguramente también murieron los huevos de *F. hepatica* liberados por el ganado por la falta de agua y el calor (Andrews, 1999). En el período de recarga, cuando aumentaron las precipitaciones y los ambientes comenzaron a retener agua, muy probablemente no había *F. hepatica* circulando ya que los estadios larvales de vida libre en el ambiente no habrían sobrevivido y ninguno de los hospedadores estaba infectado (Fig. 6.7 A,B). Esta situación se mantuvo durante gran parte del segundo período húmedo, aun cuando las condiciones ambientales se restituyeron completamente y se asemejaron a las registradas en el 1ºPH y la población de *L. columella* era muy abundante.

Llama la atención que la infección por *F. hepatica* apareció simultáneamente en *L. columella* y en las vaquillonas de la segunda cohorte un año después de haberse terminado la sequía (Fig. 6.7 A,B). Si se considera el tiempo de desarrollo del parásito en el caracol, las *L. columella* tuvieron que haberse infectado por lo menos 4 semanas antes (Graczyk y Fried, 1999). Seguramente ingresaron en el establecimiento bovinos infectados que comenzaron a eliminar sus huevos en los ambientes donde se encontraban poblaciones muy abundantes de *L. columella* (Fig. 5.4) permitiendo el restablecimiento de la transmisión. Esto mismo fue lo que ocurrió con las vaquillonas de la primera cohorte, que luego de su estadía de 1 año en un establecimiento en Ita Ibaté regresaron con un 7,7% de infección (Fig. 6.7 A).

Estos resultados muestran como un evento de stress ambiental tan severo como una sequía de 6 meses que provocó la desecación completa de todos los cuerpos de agua del establecimiento, logró interrumpir naturalmente el ciclo de transmisión de *F. hepatica* en el Departamento de Berón de Astrada hasta un año después de haberse restaurado las condiciones climáticas. Una situación similar fue observada en Louisiana, USA, donde el déficit de humedad sostenido del verano interrumpió momentáneamente la transmisión de *F. hepatica* (Malone *et al.*, 1984). Sin embargo, no siempre una sequía prolongada logra interrumpir el ciclo de transmisión de este parásito. Por ejemplo, en San Pablo, Brasil, una sequía de 6 meses redujo la prevalencia en *L. columella* a 0% pero el parásito persistió en el ganado, con lo cual apenas mejoraron las condiciones climáticas aumentó rápidamente la prevalencia en los caracoles (Amato *et al.*, 1986).

En este trabajo se pudo observar como las condiciones climáticas influyeron en la dinámica poblacional de *L. columella* (Capítulo 5) y cómo esto último determinó la dinámica de transmisión de la fasciolosis. Esta relación entre la dinámica de transmisión de *F. hepatica*, la ecología del hospedador intermediario y las variables climáticas ha sido mencionada numerosas veces (Boray, 1993; Mattos *et al.*, 1997; Ollerenshaw, 1971b). En el norte de la Provincia de Corrientes la dinámica de transmisión de *F. hepatica* estuvo influenciada básicamente por la humedad y no tanto por la temperatura. La falta de humedad resultó ser un factor limitante para la población de *L. columella* que tuvo que estivar para sobrevivir a los períodos de sequía, con la consecuente disminución de su abundancia y la pérdida de su infección, ya que los caracoles infectados no resistieron las condiciones de stress ambiental. Y por el otro lado, la falta de humedad también afectó a los estadios de vida libre de *F. hepatica*, como los huevos y las metacercarias, susceptibles a la desecación y al calor. Esto mismo fue observado en zonas con veranos secos y calurosos como Perú (Claxton *et al.*, 1997), Brasil (Amato *et al.*, 1986), México (Cruz-Mendoza *et al.*, 2005) y USA (Malone *et al.*, 1984). Sin embargo, esta situación difiere de lo observado en zonas templadas donde la transmisión se ve limitada por la temperatura y no por la humedad (Claxton *et al.*, 1997). De hecho, en los valles Andinos Patagónicos de la provincia de Chubut, la temperatura resultó ser un factor limitante para el desarrollo de *L. viatrix* y por lo tanto para la transmisión del parásito (Kleiman *et al.*, 2007). En esta región la disponibilidad de ambientes aptos para el desarrollo del caracol se concentra entre primavera y otoño cuando la temperatura máxima esta por encima de los 10ºC, permitiendo el desarrollo de los caracoles (Kleiman *et al.*, 2007).

De lo expuesto hasta aquí se desprende la importancia de conocer a nivel local, como afectan los distintos factores abióticos a la dinámica de transmisión de *F. hepatica*. Esta información resulta fundamental para diseñar medidas de control más efectivas.

6.6.5. Propuesta de un programa de control

La erradicación de ciclos tan complejos como el de *F. hepatica* es algo prácticamente imposible de llevar a cabo y en general el control apunta a reducir la contaminación del parásito en el ambiente mediante la implementación de programas integrados que incluyen también evitar el contacto del ganado con pasturas muy contaminadas (Torgerson y Claxton, 1999). Por lo tanto, el conocimiento generado en este trabajo resulta sumamente importante a la hora de diseñar estrategias efectivas de control ya que el sistema después de una sequía vuelve a cero y a partir de allí resulta más fácil limitar el desarrollo de esta parasitosis. Dado que en la zona de estudio las sequías son cada vez más frecuentes y prolongadas, resulta imprescindible transmitir este conocimiento a los productores y veterinarios, para poder adoptar medidas preventivas tendientes a reducir el ingreso de *F. hepatica* desde otras regiones y evitar la recirculación del parásito luego de estos períodos desfavorables. En este sentido se recomienda diagnosticar previamente la condición sanitaria de todo animal que ingrese al establecimiento, para evitar introducir animales infectados con *F. hepatica* que inmediatamente empezarían a eliminar huevos en los ambientes habitados por poblaciones muy abundantes de *L. columella*. Como primer medida se debería ubicar a los animales nuevos en sitios restringidos, bien delimitados, aislados de los animales locales y sin presencia de ambientes dulceacuícolas con presencia de *L. columella*, en los cuales deberían permanecer hasta saber si están infectados. En caso de detectarse infección por *F. hepatica* se los debería tratar con un antiparasitario específico efectivo contra los adultos y los juveniles del parásito para eliminar completamente la infección.

Las medidas básicas para el control de la fasciolosis están focalizadas en controlar al parásito en el hospedador definitivo, en el ambiente y en controlar al hospedador intermediario (Olaechea, 2007). El uso de antihelmínticos es la práctica más común para controlar al parásito en el hospedador definitivo y el objetivo del tratamiento es el de eliminar el agente causal de la enfermedad e interrumpir la excreción de los huevos con la materia fecal para reducir la contaminación de las pasturas y prevenir la infección de los caracoles (Cringoli *et al.*, 2006). A su vez, las drogas utilizadas para el tratamiento antihelmíntico

juegan un papel muy importante en el control de la fasciolosis y la eficiencia de cada una sobre los estadios de *F. hepatica* debe ser tenida en cuenta en los programas de control (Olaechea, 2007). Por ejemplo, si se aplica una droga efectiva contra los estadios maduros e inmaduros del parásito, serían necesarios tratamientos regulares a intervalos de 12-13 semanas para reducir la intensidad y la prevalencia del ganado (Torgerson y Claxton, 1999). Sin embargo, este tratamiento solo sería efectivo en el caso de no existan reservorios silvestres del parásito o cursos de aguas que puedan recontaminar las pasturas (Torgerson y Claxton, 1999). En el caso de utilizar Triclabendazol, una de las drogas efectivas contra juveniles y adultos, lo recomendable sería aplicarlo cada 2 meses en los momentos de mayor riesgo de infección, ya que este es el tiempo que tarda un juvenil en migrar a los ductos biliares y desarrollarse sexualmente (Andrews, 1999). Esto indica que las metacercarias ingeridas inmediatamente después del tratamiento se convertirán en adultos a partir de la 8va semana y comenzarán a eliminar huevos (Andrews, 1999), siendo este el momento de aplicar la droga nuevamente. Este tipo de tratamiento demostró ser muy efectivo en Nueva Zelanda, donde la prevalencia se redujo al 5% luego de tratar todas las vacas y las ovejas con esta droga cada 8-11 semanas (Boray, 1985). Si la droga utilizada es sólo efectiva contra parásitos adultos (14-16 semanas), es necesario aplicar tratamientos más frecuentes (Boray, 1993) y ahí es donde entra en juego la resistencia del parásito a las drogas (Fairweather y Boray, 1999). Otro tema a tener en cuenta es el alto costo de las drogas utilizadas que muchas veces limita la cantidad de aplicaciones posibles de realizar. Una manera de evitar el uso excesivo de drogas es el movimiento de los animales a zonas del establecimientos con pasturas menos contaminadas por ejemplo zonas altas o sin ambientes donde se desarrollen los caracoles (Olaechea, 2007).

Para diseñar un programa de control efectivo en el norte de la Provincia de Corrientes, se debe tener en cuenta el patrón de transmisión observado durante el primer período húmedo, ya que representa lo que puede ocurrir durante un período “estándar” y sin ningún evento extraordinario o desfavorable como sequías o inundaciones que altere el ciclo de transmisión de *F. hepatica*. Durante este período los caracoles presentaron prevalencias altas en otoño, invierno y en el verano más seco, lo cual indicaría que la disponibilidad de metacercarias aumenta considerablemente durante estas estaciones y éstas permanecen infectivas para el ganado ya que tanto la temperatura como la humedad son adecuadas. A su vez, el ganado estuvo infectado durante todo el período, con lo cual la eliminación de huevos al ambiente fue constante. La homogeneidad que presentan los potreros en el establecimiento hace que no sea posible ubicar al ganado en zonas menos contaminadas, siendo la aplicación de antihelmínticos la única opción para controlar la parasitosis.

En base a esta información se considera que la siguiente estrategia de tratamientos con Triclabendazol sería la más adecuada para aplicar en el norte de la Provincia de Corrientes para controlar la fasciolosis:

1) 1º dosis al **final del verano** para eliminar los parásitos instalados desde la primavera y reducir la contaminación de las pasturas en otoño cuando los caracoles son muy abundantes;

2) 2º dosis a **mitad del otoño** (2 meses después de la 1º dosis), para eliminar los parásitos ingeridos desde el fin del verano y reducir la contaminación de las pasturas en otoño cuando los caracoles son muy abundantes;

3) 3º dosis a **principios del invierno** (2 meses después de la 2º dosis) para eliminar los parásitos ingeridos desde la mitad del otoño y reducir la contaminación de las pasturas en invierno cuando los caracoles son muy abundantes;

4) 4º dosis al **final del invierno** (2 meses después de la 3º dosis) para eliminar los parásitos ingeridos desde principios del invierno y reducir la contaminación de las pasturas en invierno cuando los caracoles son muy abundantes;

En primavera no haría falta aplicar una dosis de Triclabendazol porque el exceso de agua en el ambiente diluye la abundancia de los caracoles y de las metacercarias disminuyendo naturalmente la probabilidad de encuentro y la prevalencia en ambos hospedadores.

5) 5º dosis a **principios de verano** para eliminar los parásitos ingeridos entre fin del invierno y fin de primavera y para reducir la contaminación de las pasturas en verano cuando los caracoles están concentrados en los pocos ambientes con agua, debido a la disminución de las precipitaciones y las altas temperaturas y el ganado se aglomera en estos ambientes para beber y consumir el pasto húmedo.

El ganado ovino debería recibir estos mismos tratamientos para evitar la contaminación de las pasturas por parte de este tipo de ganado y efectivamente controlar esta parasitosis y mantener lo más bajo posible los niveles de infección.

Si bien se mencionó a lo largo de este trabajo que la epidemiología de la fasciolosis debe ser estudiada localmente para implementar medidas de control, la propuesta realizada en este trabajo podría hacerse extensiva a otras zonas de Argentina con clima subtropical y con presencia de humedales temporarios como Bañados, Esteros y Malezales.

6.7 Conclusiones

6.7.1 En el Norte de la provincia de Corrientes se detectó un foco de transmisión de *Fasciola hepatica* bien establecido con altas prevalencias en el hospedador definitivo e intermediario,

6.7.2 *Lymnaea columella* es el único hospedador intermediario involucrado en la transmisión,

6.7.3 Este hallazgo de infección natural por *F. hepatica* en *L. columella* constituye el primer registro para la Argentina,

6.7.4 La prevalencia general de *L. columella* fue de 2,1%, considerando sólo los caracoles infectados con cercarias maduras de *F. hepatica*

6.7.5 Sólo se encontraron *L. columella* infectadas en los períodos húmedos, lo cual indica que la presencia constante de agua resultó imprescindible para la continuidad del ciclo de transmisión,

6.7.6 La abundancia y el tamaño de *L. columella* mostraron una relación inversa con la prevalencia de *L. columella*,

6.7.7 La prevalencia de *L. columella* y del ganado bovino fue mayor antes que después de la sequía, reflejando la influencia negativa del período seco en la transmisión del parásito,

6.7.8 **Antes de la sequía** (primer período húmedo) la prevalencia de *L. columella* osciló entre 0 y 9% y la del ganado entre 7,9 y 95%,

6.7.9 Las vacas y las vaquillonas presentaron mayores prevalencias que los terneros,

6.7.10 Entre las *L. columella* infectadas (n= 127) más del 70% eran medianas (6,6-13,1 mm) y el 94,5% provenía de los canales anchos del Malezal,

6.7.11 Hubo transmisión durante todo el período pero en otoño e invierno se observaron los picos máximos, lo cual podría deberse a que en estas estaciones ni la temperatura máxima del aire ni el nivel de agua limitaron el desarrollo del caracol y del parásito dentro y fuera de este,

6.7.12 **Durante la sequía** (período seco) no se encontraron caracoles vivos y la prevalencia en el ganado disminuyó gradualmente de 3,8% a 0%, reflejando la disminución en la oferta de metacercarias viables en el ambiente a causa del calor y la falta de agua,

6.7.13 **Inmediatamente después de la sequía** (período de recarga) los caracoles que habrían emergido de la estivación no estaban infectados y el ganado bovino se mantenía sin infección,

6.7.14 **Después de la sequía (**segundo período húmedo) cuando las condiciones climáticas y ambientales estaban completamente restauradas, los caracoles se recuperaron rápidamente pero la infección por *F. hepatica* reapareció simultáneamente en ambos hospedadores un año después de haberse terminado la sequía (caracoles (0,1%) y ganado (1,6-7,7%)),

6.7.15 En el norte de la Provincia de Corrientes la dinámica de transmisión de *F. hepatica* estuvo influenciada básicamente por la humedad y no tanto por la temperatura.

6.7.16 Si hay humedad suficiente en los ambientes la transmisión ocurre durante todo el año.

6.7.17 La falta de humedad limita transmisión porque 1) afecta la dinámica poblacional de *L. columella*, que tiene que estivar para sobrevivir con la consecuente disminución de su abundancia y la pérdida de su infección y 2) afecta el desarrollo y la viabilidad de los estadios de vida libre de *F. hepatica* (huevos, miracidios, cercarias y metacercarias) que mueren rápidamente por calor y falta de agua.

6.7.18 De hecho una sequía de 6 meses interrumpió de manera natural la transmisión del parasito hasta un año después de haberse restaurado las condiciones climáticas y ambientales.

Capítulo 7

BIBLIOGRAFÍA

Abramson J.H. 2004. WINPEPI (PEPI-for-Windows) computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives and Innovations*, 1:6. Disponible en Internet en: www.epi-perspectives.com/content/1/1/6.

Abrous M, Rondelaud D y Dreyfuss G. 1999. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: infuence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology research*, 85:765-769.

Amato S.B, DeRezende H.E.B, Gomes D.C y Freire N.M DaSerra. 1986. Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraiba River Valley, Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 22 (3-4):275-284.

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

Aono K, Fusada A, Fusada Y, Ishii W, Kanaya Y, Komuro M, Matsui K, Meguro S, Miyamae A, Miyamae Y, Murata A, Narita S, Nozaka H, Saito W, Watanabe A, Nishikata K, anazawa A, Fujito Y, Okada R, Lukowiak K y Ito E. 2008. Speed of back-swimming of lymnaea. *Acta Biologica Hungarica*, 59 (suppl):105-109.

Appleton C.C. 1974. The Population Fluctuations of Five Fresh-water Sanil Species in the Eastern Transvaal Lowveld, and their Relationship to Known Bilharzia Transmission Patterns. *South African Journal of Science*, 70:145-150.

Appleton C.C. 2003. Alien and invasive fresh water Gastropoda in South Africa. *African Journal of Aquatic Science*, 28 (1):69-81.

Bacigalupo J. 1934. Distomatosis por *Fasciola hepatica*. Su ciclo evolutivo en la República Argentina. Buenos Aires, A. Lopez, pp 218.

Baker F.C. 1908. Suggestions for a natural classification of the family Lymnaeidae. *Science new series*, 27:942-943.

Barbosa F y Barbosa C. 1994. The Bioecology of Snail Vectors for Schitosomiasis in Brazil. *Cad. Saúde Públ.*, 10 (2):200-209.

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

Bargues M, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner R.A, Pointier J.P, Jackiewicz M, Meier-Brook C y Mas-Coma S. 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiases, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 1:85-107.

Bargues M.D, Mangold A, Muñoz-Antoli C, Pointier J.P y Mas-Coma S. 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fasciolasis in south and central America. *Journal of parasitology*, 83 (6):1086-1092.

Behm C.A y Sangster N.C. 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. En: *Fasciolosis*, J. P. Dalton (Ed). London, UK, CABI International, pp 544.

Berenguer J.G. 2007. Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés. Buenos Aires, Editoral UBe, pp 517.

Boray J.C. 1964. Studies on the ecology of *Lymnaea tomentosa*, the intermediate host of Fasciola hepatica. *Australian Journal of Zoolology*, 12:217-30.

Boray J.C. 1967. Host-Parasite Relationship between Lymnaeid Snails and *Fasciola hepatica*. *Offprint from Veterinary Medical Review "The Reaction of the Host to Parasitism"*:132-140.

Boray J.C. 1969. Experimental fasciolosis in Australia. *Advance Parasitology*, 7:95-210.

Boray J.C. 1981. Fascioliasis and other trematode infections. I. En: *Recent advances in research on Fasciola and other trematodes of animals. Review of Advances in Parasitology*, W. Slusarski (Ed). Polonia PWN-Polish Scientific Publishers, 317-339.

Boray J.C, Fraser G.C, Williams J.D y Wilson J.M. 1984. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Australian veterinary Journal*, 62:4-6.

Boray J.C. 1985. Flukes of Domestic Animals. En: *Parasites, pests and predators*, S. M. Gaafar, W. Howard and R. Marsh (Ed). Amsterdam, Elsevier, 179-218.

Boray J.C. 1993. Liver fluke disease in sheep and cattle. En. M. McDonald and K. Jacobson, Agfact - NSW Agriculture, pp 16.

Buchon P, Cuenca H, Quiton A, Camacho A.M y Mas-Coma S. 1997. Fasciolasis in cattle in the human high endemis region of the bolivian northern altiplano. *Research and reviews in Parasitology*, 57 (2):71-83.

Bush A.O, Lafferty K.D, Lotz J.M y Shostak A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al* revisited. *Journal of parasitology*, 83 (4):575-583.

Cabrera A.L y Willink A. 1973. Biogeografía de América latina. *Monografía 13. Serie Biología OEA. Washington*:120 pp.

Calienes A.F, Fraga J, Pointier J.P, Yong M, Sanchez J, Coustau C, Gutierrez A y Théron A. 2004. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, 92:83-87.

Canevari P, Blanco D.E, Bucher E.H, Castro G y Davidson I. 1999. Los humedales de la Argentina. En: *Los humedales de la Argentina: Clasificación, situación actual, conservación y legislación.*, P Canevari, D.E Blanco, E.H Bucher, G Castro and I. Davidson (Ed). Buenos Aires, Wetlands Internacional Publ, pp 208.

Cañete R, Yong M, Sánchez J, Wong L y Gutiérrez A. 2004. Population dynamics of intermediate snails hosts of *Fasciola hepatica* and some environmental factors in San Juan y Martinez municipality, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98 (3):257-262.

Carnevali R. 1994. Fitogeografía de la Provincia de Corrientes. Corrientes, Argentina, Edic. del autor, Gobierno de la provincia de Corrientes, INTA, pp 324

Caron Y, Lasri S y Losson B. 2007. *Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 149:95-103.

Caron Y, Rondelaud D y Losson B. 2008. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special enfasis on *Fasciola* sp. *Parasitology research*, 103:735-744.

Carvalho G.A, Ueta M.T y Andrade C.F.S. 2001. Búsqueda de xifidiocercarias (Trematoda) en moluscos de agua dulce recolectados en nueve municipios del Estado de São Paulo, Brasil. *Boletín chileno de parasitología*, 56 (1-2):3-9.

Carvalho O.S, Cardoso P.C.M, Rumi A, Roche A, Berne E, Muller G y Caldeira R.L. 2004. The use of Polymerase Chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with classical morphology for characterization of *Lymnaea columella, L. viatrix* and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz,*, 99 (5):503-507.

Castellanos Z.A y Landoni N.A. 1981. La Familia Lymnanaeidae Rafinesque, 1815, en la Argentina. En: *Fauna de agua dulce de la República Argentina*, Volumen 15: Moluscos Gasterópodos, R. A. Ringuelet (Ed). Buenos Aires, Argentina, FECIC, 55-82.

Claxton J.R, Zambrano H, Ortiz P, Amorós C, Delgado E, Escurra E y Clarkson M.J. 1997. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitology International*, 46:281-288.

Claxton J.R, Sutherst J, Ortiz P y Clarkson M.J. 1999. The Effect of Cyclic Temperatures on the Growth of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea viatrix*. *The Veterinary Journal*, 157:166-171.

Clery D., Torgerson P. y Mulcah G. 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 62:71-82.

Coelho L.H.L y Lima W.S. 2003. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Helminthology*, 77 (1):7-10.

Coelho L.H.L. 2007. *Lymnaea columella*: Dinâmica de populações em itajubá, MG, e suscetibilidade à infecção por *Fasciola hepatica* em associações simpátricas e alopátricas entre parasito e hospedeiro. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte. Doctor, pp 112.

Coelho L.H.L, Guimaraes M.P y Lima W.S. 2008. Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology*, 82:77-80.

Cowardin L.M, Carter V, Golet F.C y LaRoe E.T. 1979. Classification of wetlands and deep water habitats of the United States, USDI Fish and Wildlife Service (FWS/OBS-79/31), pp 103.

Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V y Genchi C. 2006. A dual anthelmintic treatment strategic scheme for the control of fasciolosis in dairy sheep farms. *Parasitology research*, 99:700-705.

Cruz-Mendoza I, Figueroa J.A, Correa D, Ramos-Martínez E, Lecumberri-López J y Quiroz-Romero H. 2004. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of México. *Veterinary Parasitology*, 121:87-93.

Cruz-Mendoza I, Ibarra-Velarde F, Quintero-Martínez M.T, Naranjo-García E, Lecumberri-López J y Correa D. 2005. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in central Mexico. *Parasitology research*, 95:283-286.

Cucher M, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbé J.H y Wisnivesky-Colli C. 2006. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology*, 137:74-82.

Dacal ARC, Costa HMA y Leite ACR. 1988. Susceptibilidade de *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* (Say, 1817) exposta à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *Rev Inst Med Trop S Paulo,*, 30:361-369.

Daniel W.W. 1990. Applied nonparametric statistics. Boston, PWS-Kent, pp 635.

Dargie J.D. 1987. The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *International Journal for Parasitology*, 17 (2):453-463.

DeKock K.N, Joubert P.H y Petrorius S.J. 1989. Geographical distribution and habitat preferences of the invader freshwater snail species *Lymnaea columella* (Mollusca: Gastropoda) in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 56:271-275.

Dennis W.R, Stone W.M y Swanson L.E. 1954. A new laboratory and field diagnostic test for fluke over in feces. *Journal American Veterinary Medicine Association*, 124:47-50.

Dillon R.T. 2000. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge, UK, Cambridge University Press pp 524

Dreyfuss G, Rondelaud D y Vareille-Morel C. 1999. Oviposition of *Lymnaea truncatula* infected by *Fasciola hepatica* under experimental conditions. *Parasitology research*, 85:589-593.

Dreyfuss G, Vignoles P y Rondelaud D. 2005. *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitology research*, 95:278-282.

Duffy T, Kleiman F, Pietrokovsky S, Issia L, Schijman A.G y Wisnivesky-Colli C. 2009. Real-time PCR strategy for rapid discrimination among main lymnaeid species from Argentina. *Acta Tropica*, 109:1-4.

Duménigo A.E y Villalvilla C.A. 1998. Detección y cuantificación de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ganado bovino *Revista Cubana de medicina tropical*, 50 (1):82-84.

Durand P, Pointier J.P, Escoubeyrou K, Arenas J.A, Yong M, Amarista M, Bargues M.D, Mas-Coma S y Renaud F. 2002. Occurrence of a sibling species complex within neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Acta Tropica*, 83 (3):233-240.

Dwinger R.H, Riche P.D Le y Kühne G.I. 1982. Fascioliasis in beef cattle in north-west Argentina. *Trop Anim Health Prod*, 14:167-171.

Escobar E.H, Ligier H.D y Matteio H.R. 1990. Suelos de la Provincia de Corrientes. En: *Atlas de suelos de la República. Argentina*, (Ed). Buenos Aires SAGyP - INTA-CIRN,

Esch G.W y Fernandez J.C. 1994. Snail-trematode interactions and parasite community dynamics in aquatic systems: A review. *The American Midland Naturalist*, 131:203-237.

Esch G.W, Barger M.A y Fellis K.J. 2002. The Transmission of Digenetic Trematodes: Style, Elegance, Complexity. *Integ. and Comp. Biol.*, 42:304-312.

Fairweather I y Boray J.C. 1999. Mechanisms of Fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. En: *Fasciolosis*, J. P. Dalton (Ed). London, UK, CABI International, pp 544.

Faria R.N, Cury M.C y Lima W.S. 2005. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in brazilian cattles. *Revue Méd. Vét.*, 156:85-86.

Ferrati R, Canziani G y Moreno D Ruiz. 2005. Esteros del Ibera: hydrometeorological and hydrological characterization. *Ecological Modelling*, 186:3-15.

Fleiss J.L. 1981. Statistical Methods for Rates and Proportions. New York, John Wiley, Sons, pp 255.

Flores R.C, Reyes L.H y Guzmán V.D.H. 2008. Ecología y medio ambiente, Cengage Learning Editores, pp 184.

Fried B. 1997. An overview of the biology of trematodes. En: *Advances in trematode biology*, B Fried and T. K. Graczyk (Ed). Florida, EEUU, CRC Press, pp 466

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

Glöer P. 2002. Die Tierwelt Deutschlands. Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas Part 73. Hackenheim, Conchbooks, pp 327.

Gomes P.A.C, Nuernberg S, Neto M Pimentel y Oliveira G Pereira De. 1975. Biologia da *Lymnaea columella* Say, 1817. *Arq. Mus. nac.*, 55:67-70.

Gonzalez-Lanza C, Manga-Gonzalez Y, Pozo-Carnero P Del y Hidalgo-Arguello R. 1989. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Veterinary Parasitology*, 34:35-43.

Graczyk T y Fried B. 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: *Fasciolosis*, J. P. Dalton (Ed). London, UK, CABI International, pp 544.

Graham A.L. 2003. Effects of snail size and age on the prevalence and intensity of avian schistosome infection: Relating laboratory to field studies. *Journal of parasitology*, 89 (3):458-463.

Gutiérrez A, Perera G, Yong M, Sanchez J y Wong L. 2000. Life-history Traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda:Lymnaeidae) under Experimental Exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95 (5):747-752.

Gutiérrez A, Perera G, Yong M y Wong L. 2001. The effect of isolation on the life-history traits of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (4):577-581.

Gutiérrez A, Yong M, Perera G, Sanchez J y Theron A. 2002a. *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gasteropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. *Parasitology Research*, 88:535-539.

Gutiérrez A, Yong M, Wong L y Sanchez J. 2002b. The Effect of Isolation on Reproduction and Growth of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae): a Snail conditioned Water Experiment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97 (6):869-870.

Gutiérrez A, Pointier J.P, Yong M, Sanchez J y Theron A. 2003. Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitol Res*, 90:129-134.

Gutiérrez A, Hernandez D y Sanchez J. 2005. Variation of snail's abundance in two water bodies harboring strains of *Pseudosuccinea columella* resistant and susceptible to *Fasciola hepatica* miracidial infection, in Pinar del Río Province, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 (7):725-727.

Gutiérrez Gregoric D., Núñez V., Rumi A. y Roche M. 2006. Freshwater gastropods from del plata Basin, Argentina. Checklist and new locality records. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 9 (89):51-60.

Harris R.E y Charleston W.A.G. 1976. The epidemiology of *Fasciola hepatica* infections in sheep on a *Lymnaea columella* habitat in the Manawatu. *New Zealand Veterinary Journal*, 24:11-17.

Harris R.E y Charleston W.A.G. 1977a. The response of the freshwater gasteropods *Lymnaea tomentosa and L. columella* to desiccation. *J. Zool., London*, 183:41-46.

Harris R.E y Charleston W.A.G. 1977b. An examination of the marsh microhabitats of *Lymnaea tomentosa* and *L. columella* (Mollusca: Gastropoda) by path analysis. *New Zealand Journal of Zoology*, 4:395-399.

Harris R.E y Charleston W.A.G. 1977c. Some temperature responses of *Lymnaea tomentosa* and *L. columella* (Mollusca: Gastropoda) and their eggs. *New Zealand Journal of Zoology*, 4:45-49.

Haseeb M.A y Fried B. 1997. Modes of transmissions of trematode infections and their control. En: *Trematode Biology*, B. Fried and T. Graczyk (Ed). Florida, USA, CRC Press, pp 466.

Heinzen T, Castro O, Pepe C y Ibarburu A (1994). *Lymnaea columella* como hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* en Uruguay. XXII Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, República oriental del Uruguay.

Hope-Cawdery M.J, Strickland K.L, Conway A y Crowe P.J. 1977. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on liveweight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. *British Veterinary Journal*, 133:145-159.

Hubendick B. 1951. Recent Lymnaeidae: Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *Kungl. Svenska Vetensk. Hand*, 3 (1):1-223.

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

Islam M.N, Port G y McLachlan A.J. 2001. The Biology of *Lymnaea peregra* (Muller) (Gastropoda:Pulmonata: Basommatophora) with Special Reference to the Effects of Herbicides on its Reproduction. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 1 (6):532-540.

Issia L, Rubel D, Tetamanzi E y Wisnivesky C. 2005. Fasciolosis en ganado ovino, Corrientes, Argentina. *Parásitología latinoamericana*, 60 (2):297 (Resumen Nº 404).

Issia L, Pietrokovsky S.M, Kleiman F, Carmanchahi P y Wisnivesky-Colli C. 2008. *Galba truncatula* Müller, 1774 (Pulmonata: Lymnaeidae) in Argentina: Presence and Natural Infection by *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea). *The Veliger*, 50 (3):185-189.

Jabbour-Zahab R, Pointier J.P, Jourdane J, Jarne P, Oviedo J.A, Bargues M, Mas-Coma S, Anglés R, Perera G, Balzan C, Khallayoune K y Renaud F. 1997. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 64:191-203.

Jokinen E.H. 1978. The aestivation pattern of a population of *Lymnaea elodes* (Say) (Gastropoda: Lymnaeidae). . *American Midland Naturalist*, 100 (1):43-53.

Jokinen E.H. 1985. Comparative life history patterns within a littoral zone snail community. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 22:3292-3299.

Jones A. 2005. Family Fasciolidae Railliet, 1895. En: *Keys to the Trematoda, Volume 2*, A. Jones, R.A. Bray and D. I. Gibson (Ed). London, UK, CABi International and Natural History Museum, pp 745.

Kandus P, Quintana R.D y Bó R.F. 2006. Patrones de paisaje y Biodiversidad del Bajo Delta del Río Paraná. Mapa de Ambientes. Buenos Aires, Grupo de Investigaciones en Ecología de Humedales (GIEH) y Wetlands Internacional, pp. 48.

Kaplan R.M, Dame J.B, Reddy G.R y Courtney C.H. 1997. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *International journal of Parasitology*, 27:1585-1593.

Keddy P.A. 2000. Wetland ecology principles and conservation. Cambridge, UK, Cambridge University Press, pp 614.

Keyyu J.D, Monrad J, Kyvsgaard N.C y Kassuku A.A. 2005. Epidemiology of *Fasciola gigantic*a and amphistomes in cattle on traditional, small-scale dairy and large-scale dairy farms in the southern highlands of Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 37 (4):303-314.

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

Kleiman F, Pietrokovsky S.M, Gil S y Wisnivesky-Colli C. 2005. Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis of fasciolosis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57 (2):181-185.

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

Krasnov B, Shenbrot G, Khokhlova I y Poulin R. 2006. Is abundance a species attribute? An example with haematophagous ectoparasites. *Oecologia*, 150:132-140.

Lafferty K.D. 1993. Effects of parasitic castration on growth, reproduction and population dynamics of the marine snail *Cerithidea californica*. *Mar Ecol Prog Ser*, 96:229-237.

Larrea C.H, Flórez F.M, Vivar G.R, Huamán M.P y Velásquez J. 2007. Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en el Perú. *Revista Horizonte Médico*, 7 (1):39-46.

León-Dancel D. 1970. Life History of *Lymnaea columella* (Say) and its Experimental Infection with *Fasciola hepatica* (L.). *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*:297-305.

Lombardero O, Moriena R, Racioppi O y Quiroz L. 1979a. Bionomía de *Limnaea* sp. en la Provincia de Corrientes. *Veterinaria*, 2 (2):5-19.

Lombardero O, Moriena R.A, Racioppi O, Coppo J.A y Schiffo H.P. 1979b. Distomatosis hepática de los bovinos en la Provincia de Corrientes. *Veterinaria*, 2 (2):21-29.

Madsen H y Frandsen F. 1989. The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, 46:139-146.

Mage C, Bourgne H, Toullieu J, Rondelaud D y 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. *Veterinary Research*, 33:439-447.

Malek E.A y Chrosciechowski P. 1964. *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* from Venezuela, and notes on the distribution of Pseudosuccinea. *The Nautilus*, 78 (2):54-56.

Malek E.A y Cogswell F.B. 1980. *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* in Colombia. *The Nautilus*, 94 (3):112-114.

Malek E.A. 1985. Fascioliasis and its snail hosts. En: *Snails host of Schistosomiasis and other snail transmitted diseases*, E. A. Malek (Ed). Washington, Tropical America: A manual, PAHO, pp 325.

Malone J.B, Loyacano A.F, Hugh-Jones M.E y Corkum K.C. 1984. A three-year study on seasonal transmission and control of *Fasciola hepatica* of the cattle in Louisiana. *Preventive Veterinary Medicine*, 3:131-141.

Malone J.B y Craig T. 1990. Cattle Liver Flukes: Risk Assessment and Control. En: *Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian*, D Bechtol and J. Pollreisz (Ed). Texas, pp 754.

Malone J.B. 1994. The landscape epidemiology of Fasciolosis: Geographic determinants of disease risk. En: *Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis - ICOPA VIII*, J. C. Boray (Ed). Izmir, 65-81.

Malone J.B y Yilma J.M. 1999. Predicting outbreaks of fasciolosis: from Ollerenshaw to satellites. En: *Fasciolosis*, J. P. Dalton (Ed). London, UK, CABI International, pp 544.

Malvárez A.I. 1999. Tópicos sobre humedales subtropicales y templados. Montevideo, Uruguay, Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe - ORCYT - pp 229.

Malvárez A.I. 2004. Consideraciones preliminares sobre un sistema nacional de clasificación e inventario de humedales. Buenos Aires, Documentos del curso-taller “Bases ecológicas para la clasificación e inventario de humedales en Argentina, pp 120.

Manga-Gonzalez Y, Gonzalez-Lanza C y Otero-Merino B. 1991. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. *Journal of Helminthology*, 65:15-27.

Manga Y, Gonzalez-Lanza C, Del-Pozo P y Hidalgo R. 1990. Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitologica Polonica*, 35:149-157.

Mas-Coma S, Esteban J.G y Bargues M. 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (4):340-346.

Mas-Coma S, Bargues M y Valero M.A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35:1255-1278.

Mattos M.J.T y Ueno H. 1986. Relacao entre idade e susceptibilidade de *Lymnaea columella* frente as infeccoes experimentais por *Fasciola hepatica*. *A hora veterinaria*, 6 (33):16-20.

Mattos M.J.T, Ueno H, Goncalves P.C y Almeida J.E.M. 1997. Seasonal occurrence and bioecology of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, 19 (6):248-252.

Maure E.A Pile, Bustamante M, Serra-Freire N.M y Gomes D.C. 1998. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de Sao Paulo, Brasil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, 35:151-155.

Minchella D.J, Leathers B.K, Brown K.M y McNair J.N. 1985. Host and parasite conteradaptations: an example from freshwater snail. *The american naturalist*, 126 (6):843-854.

Mitsch W.J y Gosselink J.G. 2000. Wetlands, (3rd edn). New York, John Wiley & Sons, pp 920.

Morales G y Morales L. 2004. *Fasciola hepatica* y Distomatosis hepática bovina en Venezuela. *Red de Helmintología de FAO para América Latina y el Caribe - Contribución a la Conferencia Electrónica 2004*.

Moriena R.A, Racioppi O, Alvarez J.D y Lombardero O. 1999. *Fasciola hepatica* y otros Trematodos de los Rumiantes. Prevalencia y Distribución en la Provincia de Corrientes (Estado de Avance). *Comunicaciones científicas, tecnológicas de la UNNE*, IV:159-161.

Moriena R.A, Racioppi O, Alvarez J.D y Lombardero O (2000). *Fasciola hepatica* y otros trematodos de los rumiantes. Prevalencia y distribución en la provincia de Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste - Comunicaciones científicas y tecnológicas 2000.

Moriena R.A, Racioppi O, Alvarez J.D y Lombardero O (2001). Fasciolosis en un rodeo bovino en el Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina). Prevalencia, seguimiento y control. Comunicaciones científicas y tecnológicas 2001.

Moriena R.A, Racioppi O, Álvarez J.D, Wisnivesky M.C y Prepelitchi L. 2007. Fasciolosis en bovinos hembras en crecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina). *Revista Veterinaria*, 18 (2):136-138.

Nari A, Cardozo H, Acosta D, Solari M A y Petraccia C. 1983. Efecto de la temperatura en el desarrollo de *Fasciola hepatica* en su huesped intermediario *Lymnaea viatrix* D'Orbigny (1835). *Veterinaria*, 19 (84):36-40.

Neiff J.J. 2003a. Los ambientes acuáticos y palustres del Iberá. En: *Limnología del Iberá. Aspectos físicos, químicos y biológicos de las aguas*, A. Poi-de-Neiff (Ed). Corrientes, Argentina, EUDENE, pp 191.

Neiff J.J. 2003b. Los ambientes acuáticos y palustres del Iberá. En: *Limnología del Iberá. Aspectos físicos, químicos y biológicos de las aguas*, A. Poi de Neiff (Ed). Corrientes, Argentina, EUDENE, 191.

Neiff J.J. 2004. El Iberá ¿En peligro?, Fundacion Vida Silvestre Argentina, pp 89.

Neiff J.J, Casco S.L y Arias J.C. 2004. Glosario de humedales de Iberoamérica. En: *Humedales de Iberoamérica.*, J. J. Neiff (Ed). Cuba, CYTED, Subprograma XVII - Red Iberoamericana de Humedales, Cuba,

Neiff J.J y Poi-de-Neiff A.S.G. 2006. Situación ambiental en la ecorregión Iberá. En: *La Situación Ambiental Argentina 2005*, A. Brown, U. M. Ortiz, M. Acerbi and J. Corchera (Ed). Buenos Aires, Fundación Vida Silvestre Argentina, pp 587.

Olaechea F.V. 2007. *Fasciola hepatica*. Trematodes y Cestodes. En: *Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes roedores en el cono sur de América*, V.H Suárez, F.V Olaechea, C.E Rossanigo and J. R. Romero (Ed), Publicaciones técnicas EEA INTA, Anguil, pp 296.

Oliveira S.M, Fujii T.U, Filha E Spósito y Martins A.M. 2002. Ocorrência de *Lymnaea columella* say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no vale do Ribeira, Sao Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 69:29-37.

Ollerenshaw C.B. 1971a. Some observations on the epidemiology of Fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *The veterinary record*, 98:152-164.

Ollerenshaw C.B. 1971b. The influence of climate on the life cycle of *Fasciola hepatica* in Britain with some observation on the relationship between climate and the incidence of fascioliasis in the Netherlands. Symposium, Lelystad.

Paraense L.W. 1975. *Biomphalaria orbigny* sp. n. from Argentina (Gastropoda: Basommatophora: Planorbidae). *Rev Brasil Biol.*, 35:211-222.

Paraense L.W. 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 77 (2):181-188.

Paraense L.W. 1983. *Lymnaea columella* in northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 78 (4):477-482.

Paraense L.W. 1984. *Lymnaea diaphana*: a study of topotypic specimens (Pulmonata: Lymnaeidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79 (1):75-81.

Paraense L.W. 1986. *Lymnaea columella*: two new brazilian localities in the states of Amazonas and Bahia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81 (1):121-123.

Paraense L.W. 2005. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Argentina (Mollusca: Basommatophora). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 (5):491-493.

Pavlovsky E.N. 1966. Natural nidality of transmissible diseases in relation to landscape epidemiology of zooanthroponoses. translated fron the russian by Y Shirokov, Moscow, URRS, Peace Publishers pp 249.

Pereyra H y Leiras M.A. 1991. Comportamiento bovino de alimentación, rumia y bebida. *Fleckvieh-Simmental*, 9 (51):24-27.

Pinheiro J, Maldonado A, Attias M y Lanfredi. R. 2004. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Parasitology research*, 93:171-177.

Pizzio R, Pallarés O Royo, Sampedro D, Aguilar D, Cetrá B y Zapata P. 1994. Unidad de cría y recría de bovinos en Ambiente de malezal. *INTA, EEA Mercedes, Corrientes*, Serie técnica Nº 35.

Poi-de-Neiff A. 2003. Invertebrados de la vegetación del Iberá. En: *Limnología del Iberá. Aspectos físicos, químicos y biológicos de las aguas*, A. Poi de Neiff (Ed). Corrientes, Argentina, EUDENE, pp 191.

Pointier J.P y Marquet G. 1990. Taxonomy and Distribution of Freshwater Mollusks of French Polynesia. *VENUS (Jap. Jour. Malac.)*, 49 (3):215-231.

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

Pointier J.P, Coustau C, Rondelaud D y Theron A. 2007. *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepaica*: first record for France in the wild. *Parasitology research*, 101:1389-1392.

Prepelitchi L y Ostrowski-de-Nuñez M. 2007. Echinostomatid larval stages in *Lymnaea viatrix* (Gastropoda: Pulmonata) from southwest patagonia, Argentina. *Journal of parasitology*, 93 (2):323-327.

Puurtinen M, Hytönen M, Knott K, Taskinen J, Nissinen K y Kaitala V. 2004. The effects of mating system and genetic variability on susceptibility to trematode parasites in a freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Evolution*, 58 (12):2747-2753.

Quiroz H.R. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Mexico, Limusa, Noriega editoriales, pp 876.

Rabinovich J.E. 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. México, CECSA, pp 313.

Rangel-Ruiz L, Marquez-Izquierdo R y Bravo-Nogueira G. 1999. Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 81:119-127.

Rangel-Ruiz L y Gamboa-Aguilar J. 2005. Estructura de la comunidad y dinámica poblacional de gasterópodos en una zona enzoótica de fasciolosis en Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 21 (2):79-85.

Remigio E.A y Blair D. 1997. Molecular systematics of the freshwater snail family Lymnaeidae (Pulmonata: Basommatophora) utilising mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Journal of Molluscan Studies*, 63:173-185.

Remigio E.A. 2002. Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus Lymnaea, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon samplig. *Parasitol Res*, 88:687-696.

Rezende H.E.B, Araújo J.L, Gomes P.A.C, Nurenberg S, Neto M.P, Oliveira G.P y Mello R.P. 1973. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymmaeidae). . *Arq Univ Fed Rural*, 3:21-23.

Riley E.M y Chappell L.H. 1992. Effect of infection with *Diplostomum spathaceum* on the internal defense system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59:190-196.

Rim H.J, Farag H.F, Sornmani S y Cross J.H. 1994. Food-borne Trematodes: Ignored or Emerging? *Parasitology Today*, 10:207-209.

Roberts J.A y Suhardono D. 1996. Approaches to the Control of Fasciolosis in Ruminants. *International Journal for Parasitology,*, 26 (8/9):971-981.

Rognlie M., Dimke K.L., Potts R.S. y Knapp S.E. 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. *Veterinary Parasitology*, 65:297-305.

Rondelaud D y Vincent M. 1974. Etude des migrations quotidiennes chez les Limnées tronquées (*Galba truncatula* Müller) saines ou parasitées par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 49:411-416.

Rubel D, Prepelitchi L, Kleiman F, Carnevale S y Wisnivesky-Colli C. 2005. Estudio del foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquén. *medicina (Buenos Aires)*, 65:207-212.

Rumi A y Hamann M. 1990. Potential Schistosome vector snails and associated Trematodes in ricefields of Corrientes Province, Argentina. Preliminary results. *Memorias Instituto Osvaldo Cruz*, 85 (3):321-328.

Rumi A. 1991. La familia Planorbidae Rafinisque, 1815 en la Republica Argentina. En: *Fauna de agua dulce de la República Argentina*, Volumen 15: Moluscos Gasterópodos, R. A. Ringuelet (Ed). Buenos Aires, Argentina, FECIC, 1-52.

Salazar L, Estrada V.E y Velásquez L.E. 2006. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Experimental Parasitology*, 114:77-83.

Samadi S, Roumegoux A, Bargues M, Mas-Coma S, Yong M y Pointier J.P. 2000. Morphological studies of Lymnaeid snails from the human Fascioliasis endemic zone of Bolivia. *Journal of Molluscan Studies*, 66:31-44.

Say T. 1817. Descriptions of seven species of American fresh water and land shells, not noticed in the systems. *Journal of the Academy of Natural Sciences Philadelphia*, 1:13-16.

Scott M.I.H. 1953. Sobre Limnaeidae argentinos. *Physis*, 20 (59):401-408.

Schmidt G.D y Roberts L.S. 1977. Fundations of parasitology. Saint Louis, MOSBY Co, pp 604.

Silva-Santos I.C, Laranja R.J, Costa N.C, Bothelo G.A, Ceresér V.H y Martin J.R. 1987. *Lymnaea columella* Say, 1817 interagindo na disseminação de fasciolose na Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito, RS. *Hora Veterinária*, 6:42-48.

Smith K.F, Dobson A.P, McKenzie F.E, Real L.A, Smith D.L y Wilson M.L. 2005. Ecological theory to enhance infectious disease control and public health policy. *Front Ecol Environ*, 3:29-37.

Sokal R.R y Rohlf F.J. 1969. Biometry. San Francisco, CA., W.H. Freeman & Co, pp 776.

Sorensen R y Minchella D. 1998. Parasite influences on host life history: *Echinostoma revolutum* parasitism of *Lymnaea elodes* snails. *Oecologia*, 115:188-195.

Sorensen R y Minchella D. 2001. Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology*, 123:s3-s18.

Southwood T.R.E. 1977. Habitat, the templet for ecological strategies? *Journal of Animal Ecology*, 46:337-365.

Souza C.P y Magalhães K.G. 2000. Rearing of *Lymnaea columella* (Say, 1817), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95 (5):739-741.

Souza C.P, Magalhaes K.G, Passos L.K, Santos G.C Pereira dos, Ribeiro F y Katz N. 2002. Aspects of the Maintenance of the Life Cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97 (3):407-410.

Spithill W, Smooker P, Sexton J, Bozas E, Morrison C, Creaney J y Parsons J. 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. En: *Fasciolosis*, J. P. Dalton (Ed). London, UK, CABI International, pp 544.

StatSoft Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system). *version 6*, www.statsoft.com.

Teles H.M.S, Leite R.P.A y Rodrigues F.L. 1991. Moluscos limnicos de uma area de Alto Araguaia (Brasil) *Revista de saude publica*, 25 (3):179-183.

Thornthwaite C.W y Mather J.R. 1957. Instructions and tables for computing evapotranspiration and the weather balance. En: *Publications in Climatology*, (Ed). New Jersey, USA, Drextel institute of Tecnology, pp 104.

Torgerson P y Claxton J. 1999. Epidemiology and control. En: Fasciolosis. J. P. Dalton (Eds). London, UK, CABI International, pp 544.

Traub R, Monis P.T y Robertson L.D. 2005. Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35:1295-1307.

Ueta M.T. 1980a. Ocorrencia de infeccao natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraiba, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 14:230-3.

Ueta M.T. 1980b. Infeccao experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*. *Rev. Saúde Pública*, 14:43-57.

Utzinger J y Tanner M. 2000. Microhabitat Preferences of *Biomphalaria pfeifferi* and *Lymnaea natalensis* in a Natural and a Man-made Habitat in Southeastern Tanzania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95 (3):287-294.

Van-Someren V. 1946. The Habitats and Tolerance Ranges of *Lymnaea (Radix) caillaudi*, the Intermediate Snail Host of Liver Fluke in East Africa. *The Journal of Animal Ecology*, 15 (2):170-197.

Vignoles P, Dreyfuss G y Rondelaud D. 2002. Larval development of Fasciola hepatica in experimental infections: variations with populations of Lymnaea truncatula. *Journal of Helminthology*, 76:179-183.

Wernicke R. 1888. Informe sobre los trabajos llevados a cabo en el laboratorio para el estudio de las enfermedades contagiosas. *Biblioteca de la facultad*, Nº 16599:Nº 17.

Wisnivesky C. 2003. Ecología y epidemiología de las infecciones parasitarias. Costa Rica, Editorial Libro Universitario Regional, pp 186.

Woolhouse M.E.J. 1989. On the interpretation of age-prevalence curves for schistosome infections of host snails. *Parasitology*, 99:47-56.

Woolhouse M.E.J y Chandiwana S.K. 1989. Spatial and temporal heterogeneity in the population dynamics of *Bulinus globosus* and *Biomphalaria pfeifferi* and the epidemiology of their infection with schistosomes. *Parasitology*, 98:21-34.

Wullschleger E y Jokela J. 1999. Does habitat-specific variation in trematode infection risks influence habitat distribution of two closely related freshwater snails? *Oecologia*, 121:32-38.

Zar J.H. 1999. Biostatistical analysis. NJ, USA Prentice-Hall, pp 663

Anexo 1

DIAGNÓSTICO DE *Fasciola hepatica* EN EL HOSPEDADOR DEFINITIVO

MÉTODO COPROLÓGICO DIRECTO
TÉCNICA DE SEDIMENTACIÓN

La técnica de sedimentación es uno de los métodos coprológicos directos utilizados para detectar huevos de *F. hepatica* en la materia fecal del hospedador definitivo. La concentración de los huevos para su posterior visualización en la lupa se basa en que el tiempo de caída de los huevos de *F. hepatica* en el agua (100 mm/minuto) es mas rápido que el de los detritos presentes en la materia fecal. La sedimentación de los huevos puede ser auxiliada con el uso de soluciones jabonosas que facilitan su desprendimiento (Dennis, Stone y Swanson, 1954).

Descripción de la Técnica de sedimentación de **Dennis, Stone y Swanson, 1954**

Reactivo:

Solución de Dennis, Stone y Swanson (SDSS)

5 ml……. Detergente concentrado

1000 ml…. Agua C.S.P.

8 gotas….. Alumbre $(SO_4)2$ Al K 1%

Colorante:

10 g……. Iodo metálico (I)

50 g……. Ioduro de potasio (IK)

100 ml…… Agua destilada

Procedimiento:

1. Homogeneizar 8 g de materia fecal de cada muestra con 300 ml de solución SDSS, evitando generar espuma.
2. Trasvasar la suspensión a un vaso cónico de 500 ml y dejar sedimentar 5` (1º lavado).
3. Eliminar el sobrenadante hasta 1 cm por encima del sedimento.
4. Agregar 500 ml de solución SDSS y dejar sedimentar 5` (2º lavado).
5. Repetir puntos 3 y 4 (3º lavado).

6. Eliminar el sobrenadante dejando 10 ml de líquido con el sedimento.
7. Trasvasar la suspensión final a una caja de petri de 10cm, agregar 2-3 gotas de colorante y dejar reposar 5`.
8. Observar bajo microscopio estereoscópico (20-40x)
9. Contar el número de huevos de *F. hepatica*

Anexo 2

PROTOCOLO PARA LA FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE MOLUSCOS DE AGUA DULCE

Relajación

- Colocar los caracoles recolectados en una solución de agua declorinada a temperatura ambiente con entre 3 y 7 cristales de mentol,
- corroborar contínuamente que se encuentren sumergidos,
- continuar con el procedimiento hasta corroborar su relajación o inmovilidad completa.

Fuente: Rangel-Ruiz y Gamboa-Aguilar, 2005

Sacrificio

- Sumergir a los caracoles relajados en agua a 70ºC durante 40-45 segundos (tiempo sugerido para animales de entre 10 y 20 mm de largo),
- inmediatamente después sumergir los caracoles muertos en agua fría para evitar la cocción excesiva de los tejidos,
- desprender el cuerpo de la conchilla tirando del pie con una pinza adecuada

Fijación y conservación

- Colocar el cuerpo de cada caracol en líquido fijador Railliet-Henry:

Solución fisiológica…….	930 ml
Formol 4% neutralizado…….	50 ml
Ácido acético glacial……	20 ml

El volumen del fijador debe ser 20 veces mayor al volumen del cuerpo

- renovar el líquido fijador a las 24 hs,
- conservar el material en el fijador por tiempo indefinido en un recipiente hermético,
- rotular con el mismo código el cuerpo y la conchilla de cada espécimen.

Fuente: Paraense, 1984

Anexo 3

PROTOCOLO PARA LA EMISIÓN DE CERCARIAS DE *Fasciola hepatica*

Inhibición de la emisión

- Colocar de a 20 caracoles vivos en recipientes de plásticos con agua declorinada,
- Llevar a la heladera y mantenerlos por 3 horas.

Estimulación de la emisión

- Retirar los recipientes con caracoles de la heladera,
- colocar los recipientes bajo una lámpara de 60 watts por 2 horas aprox.
- Identificar los recipientes con cercarías nadando o metacercarias enquistadas,
- Aislar individualmente los 20 caracoles en nuevos recipientes con agua, para identificar al/los infectado/s (caracoles positivos).
- Repetir el procedimiento por 10 días.
- Disecar a los caracoles negativos para buscar otros estadios larvales de *F. hepática*

Identificación de *F. hepática*

- Colocar los caracoles positivos sobre un portaobjeto,
- Realizar su disección bajo un microscopio estereoscópico,
- Aislar las cercarías y demás estadios larvales presentes,
- Estudiarlos en vivo bajo un microscopio óptico, observando sus características morfológicas (ver Capítulo 1),
- Fijarlos en formol caliente para su posterior identificación.

Anexo 4

Trabajos científicos publicados a partir de la información generada en esta tesis.

1) **Prepelitchi L,** Kleiman F, Pietrokovsky SM, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez J, Wisnivesky-Colli C. **2003.** First Report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) Naturally Infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus,1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (7): 889-891.

2) Cucher M.A., Carnevale S., **Prepelitchi L.**, Labbé J.H., Wisnivesky-Colli C. **2006**. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology.* 137: 74-82.

3) Moriena R.A., Racioppi O., Álvarez J.D., Wisnivesky M.C., **Prepelitchi L**. **2007**. Fasciolosis en bovinos hembras en crecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina). *Revista Veterinaria*, 18(2): 136-138.

SHORT COMMUNICATION

First Report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) Naturally Infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus,1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina

Lucila Prepelitchi/+, Florencia Kleiman, Silvia M Pietrokovsky, Ricardo A Moriena*, Oscar Racioppi*, José Alvarez*, Cristina Wisnivesky-Colli

Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parásitos, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. II, C1428EHA, Buenos Aires, Argentina
*Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

We report the first evidence of natural infection of Lymnaea columella *with* Fasciola hepatica *in Argentina. A sample of 601 snails was collected in May 2003 in northeastern Corrientes, a province bounded on the north by Paraguay, on the east by Brazil and on the southeast by Uruguay. Among 500 examined snails, 44 (8.8%) were exclusively infected with* F. hepatica*. Parasite identification was based on morphological features of cercariae from snails, and of eggs and adult flukes from Wistar rats. We discuss the events suggesting that an enzootic transmission cycle of* F. hepatica *has been recently established in northeastern Corrientes.*

Key words: *Lymnaea columella* - *Fasciola hepatica* infection - Argentina

Fasciolosis, caused by the zoonotic liver fluke *Fasciola hepatica*, is an important disease of domestic livestock producing a worldwide economic loss. Snails belonging to genus *Lymnaea* are the known intermediate hosts of *F. hepatica*. In the Southern Cone of South America, *Lymnaea columella* has been found in Brazil (Paraense 1982, 1983, 1986, Abilio & Watanabe 1998, Souza et al. 1998, 2002, Oliveira et al. 2002), Paraguay (Hubendick 1951), Uruguay (Del Huerto López Lemes et al. 1996), and Argentina (Scott 1953, Castellanos & Landoni 1981, Paraense 1982). However, the occurrence of specimens naturally infected with *F. hepatica* has only been reported from Brazil (Rezende et al. 1973, Schafranski et al. 1977, Silva Santos et al. 1987, Ueta 1980, Fujii & Oliveira 1996, Oliveira et al. 2002, Coelho & Lima 2003). In Uruguay, search of the parasite in *L. columella* rendered negative results (Del Huerto López Lemes et al. 1996) and, to our knowledge, in Paraguay and Argentina no parasitological analysis has ever been conducted.

The objective of the present study is to report the first finding of *L. columella* naturally infected with *F. hepatica* in Argentina.

A sample of 601 snails was collected in May 2003 from waterbodies within a private farm at the locality of Berón de Astrada (27º33'S;57º32'W), in the northeast of Corrientes province, Argentina. This province is bounded on the north by Paraguay, on the east by Brazil and on the southeast by Uruguay. The studied area belongs to the Amazonian phytogeographic dominion, Paranense province (Cabrera & Willink 1980). The sampling sites were temporary streams bordered on both sides by aquatic vegetation and grass. These streams, which were frequently visited by free roaming cows, collected water from a permanent lagoon. Snails were taken to the laboratory in plastic recipients holding wet cotton pads. Upon arrival, five specimens were relaxed, killed, and preserved in Railliet-Henry's fluid (Paraense 1984), and taxonomically determined by features of the shell and internal organs (Paraense 1983). The rest of the individuals, which were identical in external appearance to those already identified, were kept alive for parasitological analysis. The shell length of all snails was measured from the apex to the anterior margin. Cercarial shedding was checked for one month according to Souza et al. (2002). Preserved and alive snails were dissected to detect trematode larvae in viscera. Determination of *F. hepatica* based on morphological features of cercariae was performed under light microscope (400x). Finally, 25 metacercariae were orally administered to each of six Wistar rats 21-24 days old to confirm identity of *F. hepatica*. Search of eggs in faeces was performed from day 30 postinfection (PI) onwards and the prepatent period was recorded. After egg detection in faeces, rats were dissected for specific determination of adult flukes.

All 601 collected snails were identified as *L. columella* (Fig. 1). The shell length ranged between 1.90-12.00 mm with a mean ± SD of 6.56 ± 1.82 mm.

In regard to infection, we examined 500 snails, of which 44 (8.8%) were exclusively infected with *F. hepatica* (Fig. 2). The shell length of infected snails ranged between 3.79-12.00 mm with a mean ± SD of 7.28 ± 1.68 mm. Twenty-nine out of the 44 infected snails (66%) were included in

Financial support: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proj. BID 1201 OC-AR PICT no. 08830)
+Corresponding author. Fax: +54-11-4576.3384. E-mail: lucilap@bg.fcen.uba.ar
Received 28 August 2003
Accepted 25 September 2003

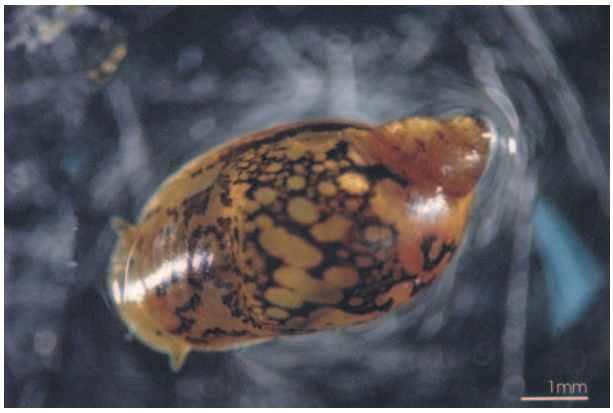


Fig. 1: *Lymnaea columella* from Corrientes, Argentina

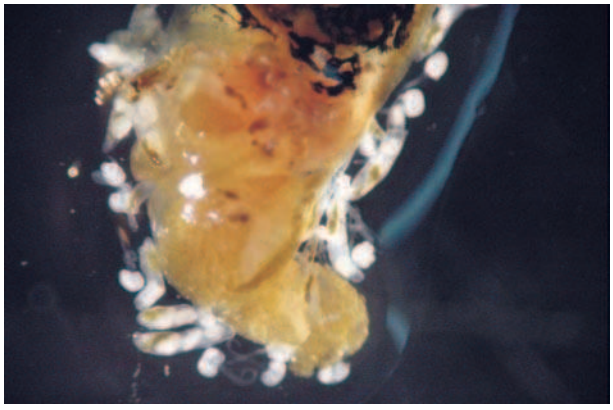


Fig. 2: rediae and cercariae of *Fasciola hepatica* in naturally infected *Lymnaea columella* from Corrientes, Argentina. 50x

the interval of 5.86-8.83 mm. Fig. 3 shows the shell length frequency distribution of dissected snails and the percentage of infection per length class.

The prepatent period of *F. hepatica* in rats was 44-49 days PI and parasite adults were found in all cases.

The first studies on the distribution, prevalence and economic impact of fasciolosis in the province of Corrientes were conducted in the 70's. At that time, the zoonosis was restricted to the central-western area (Lombardero et al. 1979b), in coincidence with the distribution of *Lymnaea viatrix*, which was the unique intermediate host incriminated in the parasite transmission (Lombardero et al. 1979a). Since then, new cases of fasciolosis were detected at slaughter-houses in the north of the province, as indicated by liver condemnation records (Moriena et al. 1999).

In northern Corrientes, the presence of *L. viatrix* has never been documented, while *L. columella* was first reported in the locality of Ituzaingó (Paraense 1982), located 82 km far from, and at the same latitude as Berón de Astrada. All these facts, together with the high infection rates in snails reported here, clearly show that an enzootic transmission cycle of *F. hepatica* has been established in the study area. One of the most important factors that possibly contributed to this scenario was the water-level increase in nearby Iberá marshes, after the Yacyretá dam was put into operation between 1989 and 1993. Water from the huge Yacyretá lake seeped into lower areas, covering more than 100,000 ha, specially in the department of Ituzaingó (Blanco & Parera 2001). Flood may have increased the number of suitable snail habitats, resulting in a positive impact on *L. columella* populations.

The prevalence of *F. hepatica* in naturally infected *L. columella* from Corrientes (8.8%) is higher than that recorded in the following states of Brazil: Minas Gerais (5.2% and 3.9%, Coelho & Lima 2003); Rio de Janeiro (2.4%, Rezende et al. 1973); São Paulo (1.22% and 0.14%, Ueta 1980; 5.26%, Oliveira et al. 2002) and Rio Grande do Sul (3.3%, Silva Santos et al. 1987). The last figure is particularly interesting since the province of Corrientes is partially bounded by Rio Grande do Sul.

In brief, our results indicate that *L. columella* may play an important epidemiological role in the transmission of *F. hepatica* in Northeast Argentina.

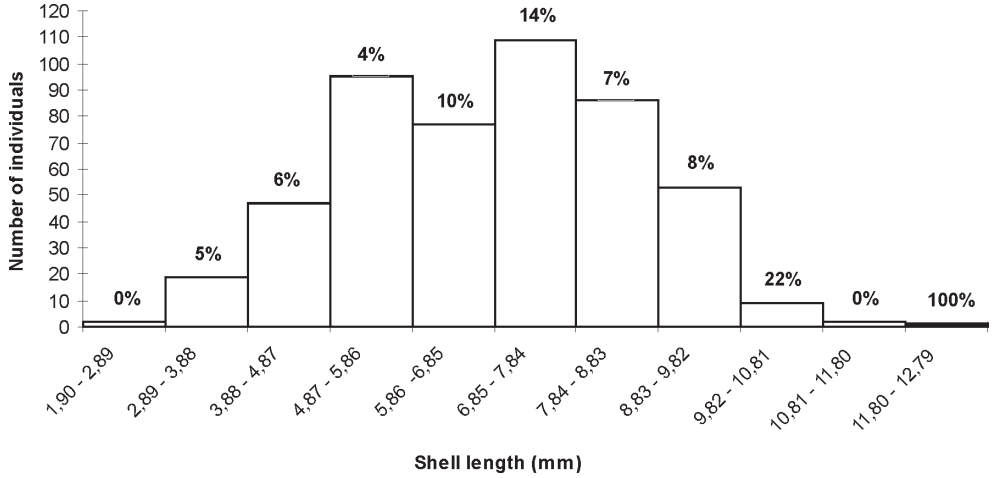


Fig. 3: shell length frequency distribution of dissected *Lymnaea columella* (N = 500) from Corrientes, Argentina. The percentage of snails infected with *Fasciola hepatica* per length class is shown on top of each bar.

REFERENCES

Abilio FJP, Watanabe T 1998. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da Fas*ciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. *Rev Saúde Pública 32*: 184-185.

Blanco D, Parera A 2001. *La Inundación Silenciosa. El Aumento de las Aguas en los Esteros del Iberá: la Nueva Amenaza de la Represa Yacyretá*, Fundación Vida Silvestre, Argentina, 27 pp.

Cabrera AL, Willink A 1980. Biogeografía de América Latina. In *Monografía 13*, *Serie Biología,* OEA, Washington, DC, p. 69-75.

Castellanos ZA, Landoni NA 1981. La familia Lymnaeidae Rafinesque, 1815, en la Argentina. In RA Ringuelet, *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina*, Profadu, Conicet, Buenos Aires, p. 55-82.

Coelho LHL, Lima WS 2003. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the state of Minas Gerais, Brazil. *J Helminthol 77*: 7-10.

Del Huerto López Lemes M, Hernández S, Acuña AM, Nari A 1996. Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. Congreso Latinoamericano de Parasitología, Santiago de Chile. Website: http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1996v1/lopez.htm/b1

Fujii TU, Oliveira SM 1996. Ocorrência de caramujos *Lymnaea columella* naturalmente infectados por *Fasciola hepatica,* no município de Miracatu, Vale do Ribeira, SP. Resultados preliminares. Jornada Paulista de Parasitologia, São Paulo, p. 17.

Hubendick B 1951. Recent Lymnaeidae: their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. *Kungl Svensk Vetenskaps Handl 3*: 1-223.

Lombardero O, Moriena R, Racioppi O, Quiroz L 1979a. Binomia de *Limnaea* sp. en la provincia de Corrientes. *Veterinaria* (Corrientes, Argentina) *2*: 5-19.

Lombardero O, Moriena R, Racioppi O, Coppo JA, Schiffo HP 1979b. Distomatosis hepática de los bovinos en la provincia de Corrientes. *Veterinaria* (Corrientes, Argentina) *2*: 21-29.

Moriena R, Racioppi O, Alvarez JD, Lombardero OJ 1999. *Fasciola hepatica* y otros trematodes de los rumiantes. Prevalencia y distribución en la provincia de Corrientes (Estado de Avance). Comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste (Argentina), Website: http://www.unne.edu.ar/cyt/cyt2000.htm

Oliveira SM, Fujii TU, Sposito Filha E, Martins AMCRPF 2002. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biológico 69*: 29-37.

Paraense WL 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the Neotropical region: a distributional outline. *Mem Inst Oswaldo Cruz 77*: 181-188.

Paraense WL 1983. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 78*: 477-482.

Paraense WL 1984. *Lymnaea diaphana*: a study of topotypic specimens (Pulmonata: Lymnaeidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz 79*: 75-81.

Paraense WL 1986. *Lymnaea columella:* two Brazilian localities in the states of Amazonas and Bahia*. Mem Inst Oswaldo Cruz 81*: 121-123.

Rezende HEB, Araújo JL, Gomes PAC, Nurenberg S, Neto MP, Oliveira GP, Mello RP 1973. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymmaeidae). *Arq Univ Fed Rural 3*: 21-23.

Schafranski NL, Vianna SSS, Saber AF 1977. Levantamento de focus de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, no Vale do Paraíba, estado de São Paulo; encontro de *Lymnaea columella* Say, 1817, naturalmente infectada. Conferencia Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinaria, p.103.

Scott MIH 1953. Sobre *Limnaeidae* argentinos. *Physis 20*: 401-408.

Silva Santos IC, Laranja RJ, Costa NC, Bothelo GA, Ceresér VH, Martins JR 1987. *Lymnaea columella* Say, 1817 interagindo na disseminação de fasciolose na Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito, RS. *Hora Veterinária 6*: 42-48.

Souza CP, Lima LC, Jannotti-Passos LK, Silva Ferreira S, Guimarães CT, Belo de Figuereido Viela L, Mariani Junior R 1998. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitos. *Rev Soc Bras Med Trop 31*: 449-456.

Souza CP, Magalhães KG, Jannotti Passos LK, Pereira do Santos GC, Ribeiro F, Katz N 2002. Aspects of the maintenance of the life cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 97*: 407-410.

Ueta MT 1980. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no vale do Paraíba, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública 14*: 230-233.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Veterinary Parasitology 137 (2006) 74–82
veterinary parasitology
www.elsevier.com/locate/vetpar

PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails

Marcela A. Cucher [a,b], Silvana Carnevale [a,*], Lucila Prepelitchi [b], Jorge H. Labbé [a], Cristina Wisnivesky-Colli [b]

[a] *Departamento de Parasitología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sársfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina*
[b] *Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parásitos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

Received 20 September 2005; received in revised form 31 October 2005; accepted 9 December 2005

Abstract

Fasciolosis, caused by the trematode *Fasciola hepatica*, is a zoonosis of economic importance in livestock that is emerging as a chronic disease in humans. The intermediate hosts are lymnaeid snails, in which diagnosis of infection is traditionally based on cercarial shedding, tissue sectioning and crushing.

We developed a PCR assay for the sensitive and specific detection of *F. hepatica* in field-collected *Lymnaea* sp. snails. A primer pair was designed to amplify a 405 bp fragment of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *F. hepatica*.

The PCR assay showed a limit of detection of 10 pg of genomic *F. hepatica* DNA. No cross-reactions were observed with samples from other related trematode species or from the snail hosts *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix*. DNA sequencing of the amplicon showed 100% homology with *F. hepatica*, and 75–89% homology with other trematodes on regions that did not include the entire set of primers.

Two samples from Argentina were analysed. For snails in sample 1 ($n = 240$), identified as *L. columella*, the infection rate was 17.5 and 51.3% by direct examination and PCR, respectively. For snails in sample 2 ($n = 34$), identified as *L. viatrix*, the infection rate was 2.9 and 61.8% by direct examination and PCR, respectively. Differences in infection rates between these diagnosis methods were significant for both samples.

Our PCR technique showed to be effective for detecting specific *F. hepatica* infections of low intensity in the intermediate host, and hence it could be used to study the epidemiological situation in a given area, as well as to assess host suitability for the parasite.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Fasciola hepatica*; *Lymnaea* sp.; PCR

* Corresponding author. Tel.: +54 11 4301 7437; fax: +54 11 4301 7437.
E-mail address: parasitologia@anlis.gov.ar (S. Carnevale).

0304-4017/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.013

1. Introduction

The common liver fluke, *Fasciola hepatica*, is the etiological agent of fasciolosis, a worldwide distributed disease that affects domestic livestock and humans (Hopkins, 1992; Rim et al., 1994). This disease causes important economic losses due to liver condemnation, higher mortality rates and reduced production of meat, milk and wool. In addition, human cases of fasciolosis have been increasing throughout the world, as documented between 1970 and 1990 (Mas-Coma et al., 2001).

The intermediate hosts involved in the transmission of the liver fluke are snails belonging to the Family Lymnaeidae. In Argentina, *Lymnaea columella* Say 1817 and *Lymnaea viatrix* Orbigny 1835, play an important epidemiological role as they have been found naturally infected with *F. hepatica*. The former is restricted to the northeast of the country (Castellanos and Landoni, 1981; Paraense, 1982; Prepelitchi et al., 2003), while the latter is more widely distributed (Paraense, 1982; Lombardero et al., 1979; Castellanos and Landoni, 1981; Rossanigo et al., 1983; Venturini and Fonrouge, 1985; Kleiman et al., 2004; Rubel et al., 2005).

The collection of accurate data on snail infection rates is crucial for estimating the potential infection risk of ruminants in endemic areas. The identification of *F. hepatica* in snails is usually based on morphological characteristics of mature cercariae. Sporocysts and rediae of *F. hepatica* and other trematodes belonging to the superfamily Echinostomatoidea show a similar morphology, and therefore direct observation by microscopy may result in low sensitivity and/or specificity at early stages of infection (prepatent period). This highlights the importance of molecular techniques for the diagnosis of the parasite regardless its developmental stage. At present, most studies on the detection of *F. hepatica* in snails using hybridisation and/or amplification methods have been conducted in experimentally infected hosts (Shubkin et al., 1992; Rognlie et al., 1994; Kaplan et al., 1995; Magalhaes et al., 2004), and only a few ones dealt with natural infections (Rognlie et al., 1996; Kaplan et al., 1997).

The goal of this work was to develop a PCR assay allowing a sensitive and specific detection of *F. hepatica* in naturally infected *Lymnaea* sp. snails by means of an optimised DNA extraction protocol.

2. Materials and methods

2.1. Parasite materials

Adult *F. hepatica* flukes obtained from the livers of naturally infected bovines at a local abattoir were washed three times with 0.01 M phosphate-buffered saline, pH 7.2, and stored at −70 °C until processing. In order to extract parasite DNA, seven flukes were mechanically disrupted and 2 ml of 100 mM Tris–HCl, pH 8.0, were added. The homogenate was filtered through two layers of gauze and then centrifuged at 6000 × *g* for 3 min. The pellet was resuspended in 600 μl lysis buffer (100 mM Tris–HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, pH 8.0, 2% SDS, 150 mM NaCl and 200 μg/ml proteinase K), and incubated for 2 h at 56 °C followed by an overnight incubation at 37 °C. The DNA was purified by a standard phenol–chloroform extraction procedure and ribonuclease A treatment (20 μg/ml) (Maniatis et al., 1989). The final pellet was resuspended in 100 μl TE (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8). The analysis of purified DNA was performed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1% agarose gel, and intensity was compared to quantitative standards.

2.2. Field-collected snails

Snails collected from water bodies located in different endemic areas of Argentina were taxonomically identified according to Paraense (1976, 1984). Sample 1 ($n = 240$), composed of *L. columella* specimens from Berón de Astrada (27°33′S and 57°32′W), Corrientes province, was collected in May 2003. Sample 2 ($n = 34$), composed of *L. viatrix* snails from La Toma (33°03′S and 65°36′W), San Luis province, was collected in March 2003.

All snails were measured from the apex to the anterior margin of the shell. To compare infection rates among different age classes, individuals in sample 1 were grouped into shell length intervals of 0.99 mm. In order to balance the number of snails in each interval, the smallest and largest sizes were joined together in intervals ranging 1.9–4.87 and 8.88–

12.87 mm, respectively. Finally, they were examined microscopically for the presence of trematode larvae as previously reported (Prepelitchi et al., 2003).

2.3. Snail DNA isolation

Following microscopic analysis, whole snail bodies were kept in 70% ethanol at 4 °C until processing. After ethanol evaporation, each sample was incubated in 300 μl of lysis buffer (100 mM Tris–HCl, pH 8, 100 mM EDTA, pH 8, 2% SDS and 150 mM NaCl) and 10 μl of proteinase K (20 mg/ml) for 3 h at 56 °C. After overnight incubation at 37 °C, 10 μl of proteinase K were added again and the samples were incubated for another 3 h at 56 °C. This was followed by a standard phenol–chloroform DNA extraction procedure (Maniatis et al., 1989) with an additional step to remove inhibitors (Kamenetzky et al., 2000). Briefly, each sample was resuspended in 1 ml of 60% GuSCN, 50 mM Tris–HCl, pH 6.4, 22 mM EDTA and 1.2% (v/v), Triton X-100. Forty microlitres of a previously autoclaved diatomaceous earth suspension (20%, w/v, in 1%, v/v, hydrochloric acid) were added to the resuspended pellet. After a 10-min incubation at room temperature with occasional vortexing, two washes with 0.5 ml of 60% (w/v), GuSCN, 50 mM Tris–HCl, pH 6.4, and two washes with 0.5 ml of 70% ethanol were performed by 1-min centrifugation at 12,000 × *g*. After drying the pellet, nucleic acids were eluted by a 10-min incubation at 56 °C in 50 μl of 5 mM Tris–HCl, pH 8. The eluted DNA was clarified by centrifugation at 12,000 × *g* during 2 min.

2.4. Primers design

The complete mitochondrial DNA sequence of *F. hepatica*, available at the GenBank Data Base (accession number X15613.1), was used to design the primer pair employed in this study. The positions were selected to amplify a 405 bp region of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (gene position corresponds to nucleotides 1888–3420 of X15613.1). The forward primer, named FhCO1F (5′-tatgttttgatttacccggg-3′), and the reverse primer, named FhCO1R (5′-atgagcaaccacaaaccatgt-3′), were based on nucleotides 2596–2616 and 3000–2980, respectively, of the above-mentioned sequence. Although data Bank search displayed no homologies with other parasites for this set of primers, an additional specificity assay was performed.

2.5. PCR procedure

Amplifications were performed in a total volume of 50 μl. The PCR mixture consisted of 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 200 μM (each) dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 μM of each primer and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase. The template used for each standard reaction corresponds to 10% of the total purified DNA from each snail (5 μl). The PCR procedure consisted of 60 s of denaturation at 95 °C, followed by 60 s of annealing at 56 °C and 90 s of extension at 72 °C, for 30 cycles. An initial step of 3 min at 98 °C and a final step of 3 min at 72 °C were included.

Fifteen microlitres of the amplification products were electrophoretically resolved in 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

All negative samples were also tested by PCR with the addition of 0.048% BSA in the reaction mix to inactivate possible remaining inhibitors.

2.6. Specificity and sensitivity assays

To test the specificity of the assay, we used trematode species other than *F. hepatica* which had been found parasitizing *Lymnaea* sp., namely *Cotylurus* sp., *Echinoparyphium* sp., *Echinostoma* sp., and some specimens of Echinostomatidae of unknown genus. Uninfected laboratory-reared *L. columella* and *L. viatrix* were also tested using the same DNA isolation and PCR protocols as described above for field-collected samples.

The sensitivity was determined using parasite-purified DNA. Background DNA samples comprising 10% of the total extracted from an infection-free *Lymnaea* sp. snail were spiked with 2.5 ng, 1 ng, 500 pg, 250 pg, 100 pg, 10 pg or 1 pg of *F. hepatica* DNA and run through PCR. Sensitivity was also tested with 2.5 ng, 500 and 100 pg in the presence of 20% of the DNA snail sample.

2.7. DNA sequencing

To confirm the sequence of the amplification product, we used one sample negative by standard

PCR protocol but positive after BSA addition. Amplicon of the right size was purified from an agarose gel with the NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel). DNA sequencing of the PCR product was performed using an ABI 377 Automated DNA Sequencer (Perkin-Elmer) with the ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Sequence similarity was analysed using the Blast program of the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nml.nih.gov), and multiple alignment employing the ClustalW 1.8 free software.

2.8. Statistical analysis

The χ^2 test was used to compare overall infection rates between the PCR assay and direct examination in the two samples, as well as relative infection rates obtained by both methods within each shell length interval in sample 1.

The kappa statistic (calculated at a 99% confidence interval) was used in both samples to determine the concordance between direct examination and the molecular method (Cohen, 1960). The comparison of kappa value among shell length intervals (test for kappa homogeneity) was performed for sample 1.

All analyses were done using the STATS and EPIDAT softwares.

3. Results

3.1. Sensitivity and specificity of the PCR technique

The PCR assay detected 10 pg of purified genomic *F. hepatica* DNA. This minimum detection level was not diminished by the presence of 10% of the total DNA extracted from an infection-free *Lymnaea* sp. snail, but it decreased to 100 pg when 20% of snail DNA was added (Fig. 1).

No cross-reactions were observed with samples from *Cotylurus* sp., *Echinoparyphium* sp., *Echinostoma* sp., or other Echinostomatidae. Likewise, no amplification was detected with DNA from uninfected laboratory-reared *L. columella* and *L. viatrix* (Fig. 2).

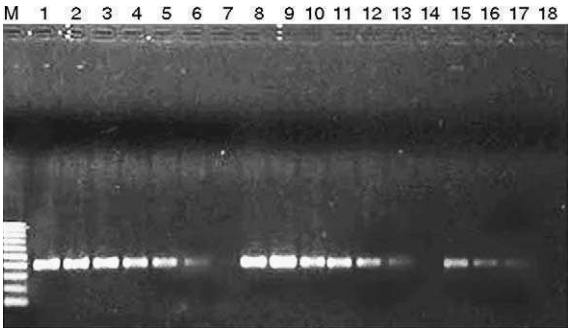


Fig. 1. Limit of detection of the PCR assay by agarose gel electrophoresis of amplification products using purified DNA of *F. hepatica* and *Lymnaea* sp. as templates. Lane M, molecular size marker (100 bp ladder); lanes 1–7, 2.5 ng, 1 ng, 500 pg, 250 pg, 100 pg, 10 pg and 1 pg of *F. hepatica* DNA, respectively; lanes 8–14, samples of *F. hepatica* DNA as described for lanes 1–7, with the addition of 10% of the DNA extracted from a whole *Lymnaea* sp. snail; lanes 15–17, 2.5 ng, 500 pg and 100 pg of *F. hepatica* DNA, respectively, with the addition of 20% of the DNA extracted from a whole *Lymnaea* sp. snail; lane 18, reaction mixture.

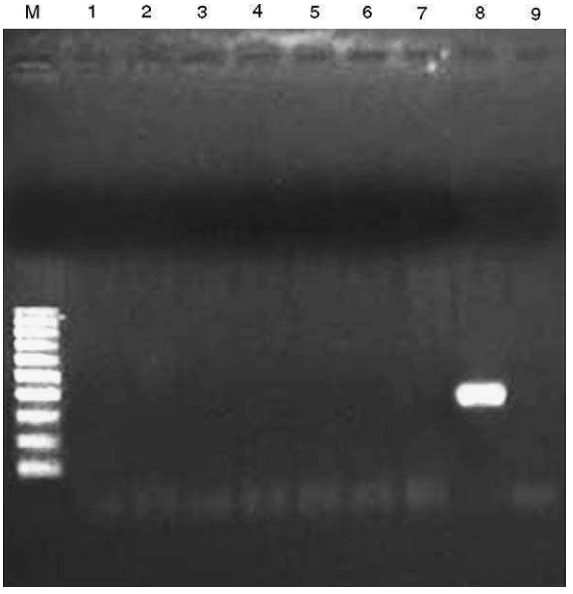


Fig. 2. Specificity analysis of the PCR assay by agarose gel electrophoresis of amplification products. Lane M, molecular size marker (100 bp ladder); lanes 1–5, template DNA extracted from *Echinoparyphium* sp., *Echinoparyphium* sp., *Echinostoma* sp., Echinostomatidae and *Cotylurus* sp., respectively; lanes 6 and 7, uninfected laboratory-reared *L. columella* and *L. viatrix*; lane 8, 2.5 ng of *F. hepatica* DNA; lane 9, reaction mixture.

Table 1
Comparison of the PCR assay with microscopy for the snails collected in Berón de Astrada, province of Corrientes (sample 1), grouped according to shell size

Shell length (mm)	No. of snails examined	No. of positive snails by PCR	Percentage of positive snails by PCR	No. of positive snails by microscopic observation	Percentage of positive snails by microscopic observation
1.9–4.87	32	15[d]	46.9	5[d]	15.2
4.88–5.87	50	24[a]	48.0	4[a]	8.3
5.88–6.87	47	25[a]	53.2	8[a]	16.3
6.88–7.87	54	31[b]	57.4	14[b]	26.4
7.88–8.87	40	16[c]	40.0	5[c]	13.9
8.88–12.87	17	12[NS]	70.6	6[NS]	28.6
Total	240	123[a]	51.3	42[a]	17.5

NS: non-significant differences.
[a] $p < 0.005$ statistically significant differences between PCR assay and microscopy.
[b] $p < 0.025$ statistically significant differences between PCR assay and microscopy.
[c] $p < 0.05$ statistically significant differences between PCR assay and microscopy.
[d] $p < 0.1$ statistically significant differences between PCR assay and microscopy.

3.2. Comparison of infection rates between direct examination and PCR assay

According to direct observation, the overall infection prevalence in *L. columella* (sample 1) was 17.5% (42/240) (Table 1). *F. hepatica* was accurately identified by the morphology of cercariae in 12 of the infected snails (28.6%), while rediae were present in the remainder. In *L. viatrix* (sample 2) only 1 out of 34 snails (2.9%) was infected (shell length: 9.01 mm), but the taxonomical identity of the parasite could not be established because only rediae were found.

Due to the morphological characteristics of the rediae found and the fact that no other trematodes within the superfamily Echinostomatoidea were present in the samples, we considered them as *F. hepatica* rediae. For further analysis, snails hosting any of the larval stages were considered as positive for *F. hepatica* by microscopic observation.

The presence of inhibitors in sample 1 was inferred from some snails positive for *F. hepatica* by direct observation but negative by the standard PCR procedure. To overcome this problem, the PCR mix was modified by the addition of 0.048% BSA. This procedure was successful, since 32.0% (55/172) and 45.8% (11/24) of the negative snails from samples 1 and 2, respectively, turned out to be positive. On this basis, we reported results of prevalence by PCR after inhibitor removal.

For sample 1, the overall prevalence of *F. hepatica* infection by the PCR technique was 51.3% (123/240) (examples in Fig. 3). Only one snail positive by direct observation was negative by PCR. Out of 123 PCR-positive snails, 82 (66.7%) were not detected by direct observation (Table 1). All immature infections previously attributed to *F. hepatica* were confirmed by PCR.

In sample 2, the PCR technique showed 61.8% (21/34) of positive snails, including the one detected by direct observation.

3.3. Statistical analysis

The overall prevalences of infection were significantly different ($p < 0.005$) between the PCR assay and direct examination for samples 1 and 2.

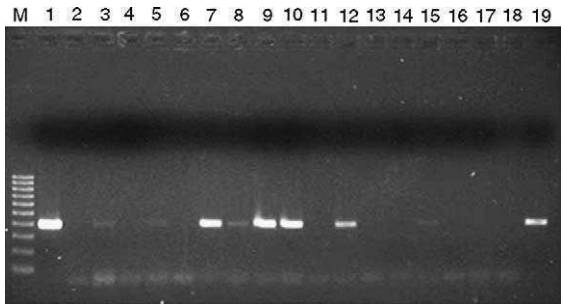


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplification products showing the feasibility of PCR assay for detecting *F. hepatica* in field-collected snail samples. Lane M, molecular size marker (100 bp ladder); lane 1, 2.5 ng of *F. hepatica* DNA; lane 2, reaction mixture; lanes 3–12, template DNA from 10 specimens of sample 1; lanes 13–19, specimens from sample 2.

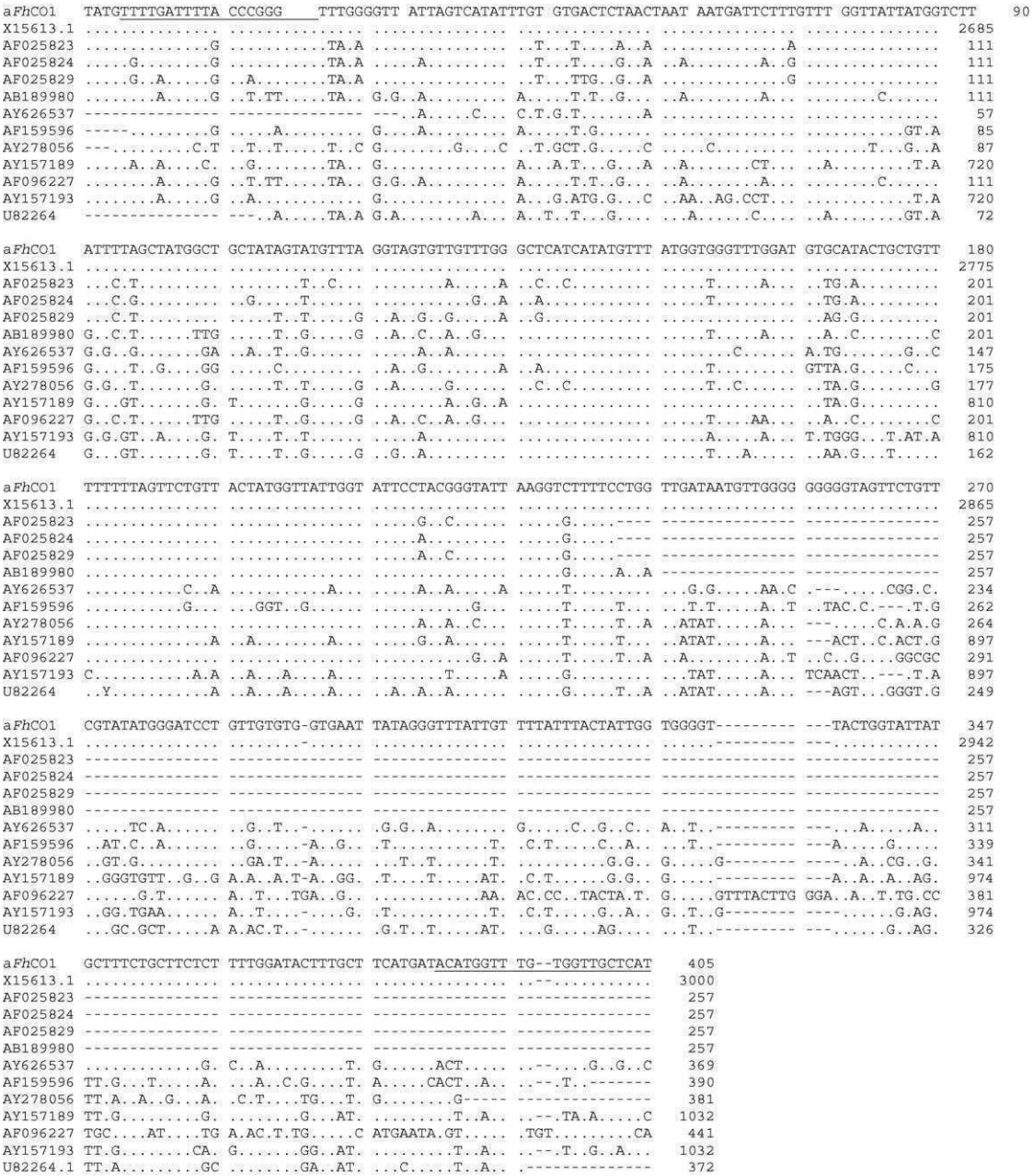


Fig. 4. Multiple sequence alignment of the PCR product (a*Fh*CO1) with sequences of cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene from different trematode species. Dots indicate base identical to a*Fh*CO1 and horizontal lines indicate gaps inserted for optimal alignment or end of the available sequence. Primer positions are underlined. Each sequence is named by its GenBank accession number. Homologies with the amplicon sequence are presented in brackets. X15613.1, *Fasciola hepatica* mitochondrion genome (100%); AF025823, *Echinostoma trivolvis* partial CO1 gene (89%); AF025824, *Echinostoma revolutum* (89%); AF025829, *Echinostoma caproni* Madagascar (87%); AB189980, *Isthmiophora hortensis* (85%); AY626537, *Cercaria shikokuensis* lineage PL3 haplotype 2 (81%); AF159596, *Paragonimus mexicanus* strain Ecuador (79%); AY278056, *Glypthelmins quieta* (77%); AY157189, *Trichobilharzia ocellata* (76%); AF096227, *Echinostoma hortense* (76%); AY157193, *Schistosomatium douthitti* (75%); U82264, *Schistosoma japonicum* (75%).

In sample 1, shell length intervals showed significant differences in infection rates between PCR and direct examination (Table 1), except for the last one (largest sizes).

Concordance between the PCR technique and direct examination was non-acceptable with kappa statistics of 0.3194 (99% C.I. = 0.2030–0.5358) and 0.0368 (99% C.I. = −0.0589 to 0.1325) for samples 1 and 2, respectively. When kappa values were calculated for each shell length interval of sample 1, they showed non-acceptable concordance between both methods (kappa < 0.4), and the test for kappa homogeneity showed non-significant differences ($p = 0.6768$) among shell length intervals.

3.4. Sequence analysis

The nucleotide sequence showed that the amplification product is a 405 bp element. The data Bank search displayed 100% homology with the region of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *F. hepatica*, contained in the mitochondrial DNA (GenBank accession number X15613.1). Homologies with other trematodes varied from 89 to 75%, but all of them were on regions that did not include the entire set of primers (Fig. 4).

4. Discussion

Traditionally, the diagnosis of *F. hepatica* infection in snails has been carried out by checking for cercarial shedding and/or microscopic examination of developmental stages of the parasite with or without snail crushing (Olsen, 1944; Khallaayoune et al., 1991). As already mentioned, this procedure has low specificity and sensitivity for early intramolluscan stages.

If field-collected snails die either before arriving at the laboratory or before cercarial release, diagnosis of *F. hepatica* by direct examination is seriously threatened and hence DNA-based tests become the most suitable diagnostic tool. In addition, our study provides the first PCR assay with a high specificity for *F. hepatica* in field-collected intermediate hosts, thus overcoming the disadvantages of the traditional method.

Our results showed that PCR detected a larger number of infected snails than direct observation, confirming our previous assumption that all rediae found belonged to *F. hepatica*.

The lack of significant differences in the infection rates of the largest-sized individuals between methods might be explained by a longer time of exposure to the parasite.

The PCR methodology developed in this study should be considered appropriate for an accurate identification of any *F. hepatica* larvae during the prepatent period of the infection, since the nucleotide sequence of the amplification product showed total homology with the region of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *F. hepatica*, and no cross-reactions were detected with other trematode species.

The PCR showed a minimal detection level of 10 pg of *F. hepatica* DNA, either in absence or presence of 10% *Lymnaea* sp. DNA. Regarding that the amount of DNA in the host depends on its total biomass, which varies markedly among individuals, we performed an assay employing 20% of the total extracted DNA.

A detection level of 100 pg was then obtained, ruling out the possibility of inhibition due to template excess.

According to Kaplan et al. (1995), a detection threshold of 1 ng is enough to recognize the presence of one miracidium by 4 h post infection. On this basis, our assay may have the sensitivity required for the detection of the parasite at early developmental stages in the intermediate host.

The high sensitivity of our PCR technique should be evaluated under experimental conditions, because abortive or recently resolved infections might lead to false positive results (van der Knaap and Loker, 1990).

In the present study, we made an attempt to avoid the interference of inhibitors in the samples using an optimised DNA extraction procedure. If 0.048% of BSA had not been added to the reaction mixture, the action of inhibitors could have produced misleading results. In this sense, prevalence of infection would have been 28.3% (68/240) instead of 51.3% (123/240) for sample 1 and 29.4% (10/34) instead of 67.8% (21/34) for sample 2. It must be stressed that the presence of inhibitors was not taken into account in previous works on experimental infections with *F. hepatica* in *L. columella* (Magalhaes et al., 2004).

As PCR detects parasite invasion and infection and microscopic examination only reveals successful infections in snails, both techniques could be used together to achieve a more comprehensive understanding of the epidemiological situation in a given area and to assess host suitability for the parasite, as suggested by Hamburger et al. (2004).

On the other hand, the use of the PCR test to detect *F. hepatica* infection in snail populations may indirectly provide information on the level of pasture contamination, an important issue concerning the control of fasciolosis in livestock.

Acknowledgements

We kindly thank Florencia Kleiman and Margarita Ostrowski for providing samples of different trematode species. We acknowledge Marta Cabrera and Jorge Velásquez for their participation in collecting sample 2, Sergio Miguel for helping with the DNA sequencing and Marcelo Rodríguez for his comments on the statistical analysis.

References

Castellanos, Z., Landoni, N.A., 1981. Mollusca, Gasteropoda, Lymnaeidae. In: Fauna de Agua Dulce de la República Argentina, vol. XV, FECIC, Buenos Aires, pp. 55–76.

Cohen, J., 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. Educ. Psychol. Meas. 20, 37–46.

Hamburger, J., Hoffman, O., Kariuki, H.C., Muchiri, E.M., Ouma, J.H., Koech, D.K., Sturrock, R.F., King, C.H., 2004. Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 71, 765–773.

Hopkins, D.R., 1992. Homing in on helminths. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 626–634.

Kamenetzky, L., Canova, S.G., Guarnera, E., Rosenzvit, M., 2000. *Echinococcus granulosus*: DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and nonfertile hydatid cysts. Exp. Parasitol. 95, 122–127.

Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1995. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. Int. J. Parasitol. 25, 601–610.

Kaplan, R.M., Dame, J.B., Reddy, G.R., Courtney, C.H., 1997. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. Int. J. Parasitol. 27, 1585–1593.

Khallaayoune, K.H., Stromberg, B.E., Dakkak, A., Malone, J.B., 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing timahdit sheep in Morocco. Int. J. Parasitol. 21, 307–314.

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

Lombardero, O., Moriena, R., Racioppi, O., Quiroz, L., 1979. Bionomía de *Lymnaea* sp. en la provincia de Corrientes. Veterinaria (Corrientes, Argentina) 2, 5–20.

Magalhaes, K.G., Konovaloff, J.P., dos Santos Carvalho, O., 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through multiplex-PCR. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 421–424.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Mas-Coma, S., Funatsu, I.R., Bargues, M.D., 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology 123, 115–127.

Olsen, O.W., 1944. Bionomics of the lymnaeid snail, *Stagnicola bulimoides techella*, the intermediate host of the liver fluke in Southern Texas. J. Agric. Res. 69, 389–403.

Paraense, W.L., 1976. *Lymnaea viatrix*: a study of topotypic specimens (Mollusca: Lymnaeidae). Rev. Bras. Biol. 36, 419–428.

Paraense, W.L., 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77, 181–188.

Paraense, W.L., 1984. *Lymnaea diaphana*: a study of topotypic specimens (Pulmonata: Lymnaeaidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 75–81.

Prepelitchi, L., Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Moriena, R.A., Racioppi, O., Álvarez, J., Wisnivesky-Colli, M.C., 2003. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 889–891.

Rim, H.J., Farag, H.F., Sornmani, S., Cross, J.H., 1994. Food-borne trematodes: ignored or emerging? Parasitol. Today 10, 207–209.

Rognlie, M.C., Dimke, K.L., Knapp, S.E., 1994. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. J. Parasitol. 80, 748–755.

Rognlie, M.C., Dimke, K.L., Potts, R.S., Knapp, S.E., 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* hosts using a DNA-based assay. Vet. Parasitol. 65, 297–305.

Rossanigo, C.E., Avila, J.D., Vásquez, R., Sager, L., 1983. Incidencia, distribución e identificación del huésped intermediario de la distomatosis bovina en la provincia de San Luis. Gaceta Veterinaria XLV 382, 739–746.

Rubel, D., Prepelitchi, L., Kleiman, F., Carnevale, S., Wisnivesky-Colli, C., 2005. Estudio de foco a partir de un caso humano de

fasciolosis en la localidad de Loncopué, Neuquén, Argentina. Medicina (B Aires) 65, 207–212.

Shubkin, C.D., White, M.W., Abrahamsen, M.S., Rognlie, M.C., Knapp, S.E., 1992. A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 78, 817–821.

van der Knaap, W.P.W., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol. Today 6, 175–182.

Venturini, L., Fonrouge, R., 1985. *Lymnaea viator* (ÓOrbingy 1835): aspectos de su biología en condiciones naturales. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 66, 340–345.

Fasciolosis en bovinos hembras en crecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina)*

Moriena, R.A.[1]; Racioppi, O.[1]; Alvarez, J.D.[1]; Wisnivesky, M.C.[2]; Prepelitchi, L.[2]

[1]Cátedra Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax: 3783-425753. E-mail: rmoriena@vet.unne.edu.ar. [2]Departamento Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas, UBA, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Moriena, R.A.; Racioppi, O.; Alvarez, J.D.; Wisnivesky, M.C.; Prepelitchi, L.: ***Fasciolosis en bovinos hembras en crecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina).*** *Rev. vet. 18: 2, 136–138, 2007.* El objetivo del trabajo fue estudiar la evolución de la fasciolosis bovina a largo plazo, a partir hembras en crecimiento al pie de madre y hasta los 3 años de edad, efectuando el diagnóstico *in vivo* por coprología y evaluando la respuesta al tratamiento instaurado (albendazole). Las tareas de campo se realizaron en un establecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina), zona donde la infestación del ganado con *Fasciola hepatica* es enzoótica. El grupo investigado estuvo inicialmente constituido por 78 animales, los que al final del ensayo se redujeron a 30. Se realizaron seis muestreos de materia fecal para estudios coprológicos por sedimentación (Dennis), los tres primeros coincidentes con los tres tratamientos antiparasitarios efectuados. El día 0 se verificó un 3,85% de animales positivos. La tasa fue de 1,30% al día 71 y de 0% durante los dos muestreos sucesivos, a los 172 y 230 días, avalando la eficacia de los tratamientos recibidos. La interrupción de la administración del antiparasitario provocó que la "fasciolosis" reapareciera al día 553 con 7,69% de animales positivos, nivel que ascendió al 80% el día 850 (ultimo muestreo). Se concluye alertando sobre los efectos contraproducentes de la práctica habitual de interrumpir los tratamientos antiparasitarios contra *F. hepatica* en animales adultos, porque ellos son los grandes diseminadores de esta enfermedad parasitaria.

Palabras clave: bovino, crecimiento, *Fasciola hepatica*, tratamiento, prevalencia.

Abstract

Moriena, R.A.; Racioppi, O.; Alvarez, J.D.; Wisnivesky, M.C.; Prepelitchi, L.: ***Fasciolosis in growing female cattle from Berón de Astrada District (Corrientes, Argentina).*** *Rev. vet. 18: 2, 136–138, 2007.* The objective of this work was to study the long term evolution of bovine fasciolosis, from growing females until they become 3 year-old heifers, performing the diagnosis *in vivo* by coprology and evaluating the effect of an albendazole treatment. Field tasks were carried out in a farm from Berón de Astrada Department (Corrientes, Argentina), area where livestock infestation with *Fasciola hepatica* is enzootic. Initially, the investigated group was constituted by 78 animals, but at the end of the trial decreased to 30. Six samplings of feces for sedimentation studies (Dennis), the three first in coincidence with the three treatments made, were carried out. At day 0, a 3.85% of positive animals was verified. The rate was 1.30% on day 71 and 0% during the two successive samplings, at 172 and 230 days, confirming the effectiveness of the treatments. The interruption of albendazole administration caused fasciolosis to reappear at day 553 with 7.69% of positive animals. This percentage ascended to 80% at day 850 (last sampling). As a conclusion, it is necessary to alert about the counteractive effects of the habitual practice of interrupting the treatment against *F. hepatica* in adult animals, because they are the most important disseminators of this parasitic illness.

Key words: cattle, growth, *Fasciola hepatica*, treatment, prevalence.

---

*Trabajo presentado en la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. de la UNNE, 2006.

Recibido: 28 junio 2007 / Aceptado: 17 setiembre 2007.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis de los bovinos, producida por *Fasciola hepatica*, es una enfermedad parasitaria ampliamente conocida en la Provincia de Corrientes. Su distribución y prevalencia está aumentando considerablemente no solo en esta provincia sino también en todo el país, irradiándose hacia zonas que posean el hábitat apropiado para el caracol intermediario [4]. En el Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina), el huésped intermediario es *Lymnaea columella* [9].

En dicho Departamento la fasciolosis bovina es enzoótica. Nuestro grupo de trabajo efectuó allí sucesivas investigaciones sobre la epizootiología y prevalencia de la enfermedad en terneros de 2 años de edad [8] y en vacas mayores de 5 años [7]. No obstante, persistían interrogantes sobre cómo y cuándo comienza la infestación de los bovinos jóvenes, especialmente en edades que comprenden desde el momento del destete hasta alcanzar aproximadamente los 3 años de edad.

La mayoría de los trabajos sobre este tema, efectuados dentro o fuera del país, abordan casi excluyentemente las tasas de prevalencia de la fasciolosis, establecidas a partir de decomisos de hígados *(post mortem)* en mataderos y frigoríficos [2, 3, 5, 6, 10]. El objetivo de esta investigación fue estudiar la evolución de la fasciolosis a largo plazo a partir de hembras bovinas post-destete, efectuando el diagnóstico *in vivo* por coprología y evaluando la respuesta al tratamiento instaurado.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en un establecimiento ganadero del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina), desde abril de 2004 hasta agosto de 2006. Se utilizó un lote de 86 hembras nacidas en 2003 y destetadas en junio de 2004, todas ellas debidamente identificadas para su seguimiento. Se utilizaron hembras debido a que los machos se venden al destete y éstas se mantienen como futuros vientres por más tiempo.

En el lapso mencionado precedentemente, se realizaron seis muestreos, a los días 0, 71, 172, 230, 553 y 850. En cada uno de ellos se extrajo materia fecal directamente del recto del animal. El diagnóstico de laboratorio se efectuó mediante coprología por sedimentación (método de Dennis, Stone & Swanson) [1], para detectar huevos de *F. hepatica*, a partir de 8 g de heces fecales. Así realizada, dicha técnica es considerada cuali-cuantitativa, permitiendo estimar el grado de infestación de *F. hepatica* en cada animal ("carga parasitaria"), expresable en huevos por gramo (hpg).

El primer muestreo se realizó el 2 de abril de 2004 (día 0) sobre 78 terneros de 7-8 meses al pie de madre (sin destetar), fecha en que todos los animales fueron desparasitados con albendazole, a fin de controlar parásitos gastrointestinales y *F. hepatica*. El segundo muestreo (77 terneros), se realizó el 12 de junio de 2004 (día 71), una semana después de haber efectuado el destete. A partir del lapso transcurrido se había cumplido otro ciclo del parásito, por lo cual pudo comprobarse tanto la posibilidad de reinfestaciones como el efecto del tratamiento. En esta fecha se administró otra vez el mismo antiparasitario.

El tercer muestreo (74 animales) se efectuó el 21 de setiembre de 2004 (día 172), incluyendo diagnóstico por coprología y nueva dosis de albendazole. El 18 de noviembre de 2004 (día 230) se practicó el cuarto muestreo (80 animales), ocasión en la cual se administró otro antiparasitario (ivermectina), no "fasciolicida". A partir de este momento los animales se trasladaron a otro establecimiento, ubicado en Itá Ibaté (Departamente General Paz, Corrientes), donde no existían antecedentes de infestación por *F. hepatica*.

Transcurrido un lapso de casi un año (323 días), 26 animales retornaron al campo de origen, debido a que la mayoría había sido vendida o faenada. Así, el 7 de octubre de 2005 (día 553) se realizó el quinto muestreo, sin administración de antiparasitarios. El trabajo finalizó el 31 de julio de 2006 (día 850) con el sexto muestreo, efectuado sobre 30 animales, a casi 10 meses del último análisis coprológico, lapso durante el cual no se efectuó ningún tratamiento antiparasitario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como indica la Figura 1, al comenzar el trabajo (día 0), sobre un total de 78 animales se registraron 3

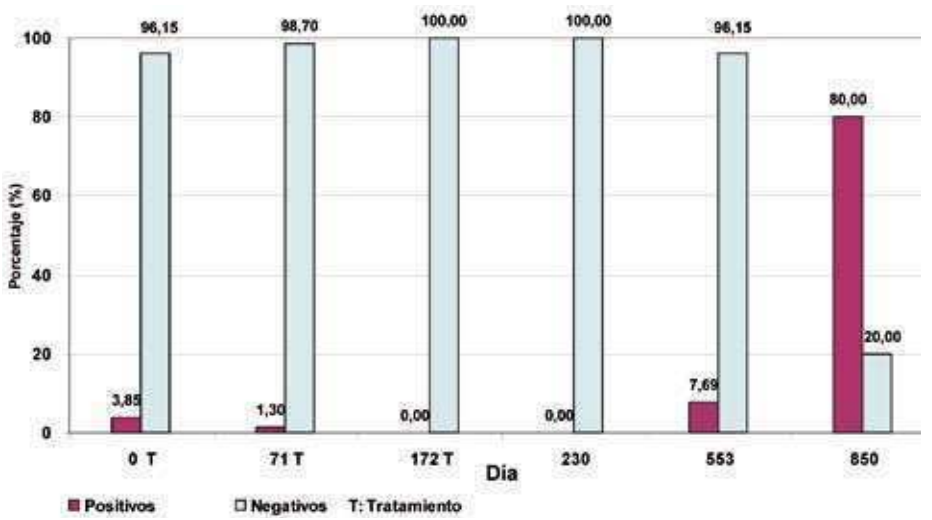


Figura 1. Incidencia de fasciolosis en un lote de bovinos en crecimiento del Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina) durante 2004-2006.

positivos a *F. hepatica* (3,85%). En la segunda toma de muestras (día 71) se verificó un solo caso positivo sobre 77 animales (1,30%). En los análisis coprológicos efectuados los días 172 y 230 (74 y 80 animales respectivamente) todas las muestras fueron negativas, lo cual indica la efectividad del tratamiento administrado. Después de pasar casi un año en otro campo (Itá Ibaté), 2 animales de los 26 ejemplares muestreados el día 553 (a los cuatro meses del traslado) resultaron positivos (7,69 %).

En la última toma de muestras (día 850), 24 de los 30 animales muestreados fueron positivos (80%). El aumento de la prevalencia en los dos últimos muestreos demuestra claramente que hubo una reinfestación manifiesta de "fasciolosis" en este grupo de animales, que durante 10 meses no recibió tratamiento antiparasitario.

Comparando estos resultados con los obtenidos en experiencias anteriores [7, 8] se concluye que la mayor prevalencia de "fasciolosis" se registra en bovinos adultos antes que en jóvenes. Pese a que los terneros pre-destete consumen relativamente menor cantidad de pasto, en un hábitat de alto riesgo como el del presente trabajo es factible que adquieran una infestación incipiente, que irá aumentando en ausencia de adecuados y oportunos controles. Los animales bajo ensayo fueron trasladados a otro establecimiento libres de *F. hepatica*, pero al regresar al campo de origen, la falta de tratamiento antiparasitario específico provocó el retorno de la "fasciolosis" y luego su incremento a tasas sucesivamente más altas.

REFERENCIAS

1. **Benbrook EA, Sloss MW**. 1965. *Parasitología Clínica Veterinaria*, Continental, México, p. 23-31.
2. **Dwinger RH, Riche LE, Kühne GI**. 1982. Fasciolasis in beef cattle in north-west Argentina. *Trop Anim Hlth Prod* 14: 167-171.
3. **Kaczorkiewicz AJ**. 1983. Distomatosis en la Provincia de Neuquen. *Rev Med Vet* 64: 354-356.
4. **Lombardero OJ, Moriena RA, Racioppi O, Quiróz L**. 1979. Bionomía de *Limnaea sp.* en la Provincia de Corrientes. *Rev Vet* 2: 5-19.
5. **López Lemes MH, Hernández S, Acuña AM**. 1995. Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. *Rev Méd Urug* (Montevideo), p. 14.
6. **Moriena RA, Racioppi O, Alvarez JD, Lombardero OJ**. 2001. *Fasciola hepatica* y otros trematodos en bovinos: prevalencia según decomisos en plantas faenadoras en la Provincia de Corrientes (Argentina). *Vet Arg* 18: 493-498.
7. **Moriena RA, Racioppi O, Alvarez JD, Lombardero OJ**. 2001. Fasciolosis en un rodeo bovino en el Departamento Berón de Astrada (Corrientes, Argentina). Prevalencia, seguimiento y control. *http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/cyt.htm* (V 001).
8. **Moriena RA, Racioppi O, Alvarez JD**. 2004. Fasciolosis en bovinos del nordeste argentino. Prevalencia según edad. *Rev Vet* 15: 3-4.
9. **Prepelitchi L, Kleiman F, Pietrokosvky S, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez JD, Wisnivesky MC**. 2003. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mem Inst Osw Cruz* 98: 889-891.
10. **Rossanigo CE, Avila JD, Vásquez R, Sager L**. 1983. Incidencia, distribución e identificación del huésped intermediario de la distomatosis bovina en la Provincia de San Luis. *Gac Vet* 45: 739-746.