

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO

DEPARTAMENTO DE PATOLOXÍA ANIMAL



**“DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE
TREMATODOSIS EN GANADO VACUNO
DE COLOMBIA: FASCIOSIS Y
PARAMPHISTOMIDOSIS”**



Tesis Doctoral
Rodrigo Bonilla Quintero
Lugo, marzo de 2016

Este estudio ha sido desarrollado gracias a la concesión del Proyecto de Investigación AGL2012-34355 (Ministerio de Economía y Competitividad, España; FEDER).



Los abajo firmantes, Profesores del Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral **“Diagnóstico y control de trematodosis en ganado vacuno de Colombia: fasciolosis y paramphistomidosis”**, que presenta el Licenciado en Veterinaria D. RODRIGO BONILLA QUINTERO para optar al Título de Doctor con Mención Internacional, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones legales precisas para su presentación y defensa pública.

En Lugo, a 26 de febrero de 2016

María Sol Arias Vázquez

Rita Sánchez-Andrade Fernández

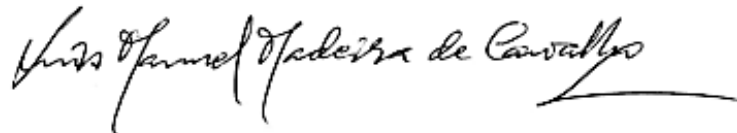
Adolfo Paz Silva



CERTIFICADO

Para los debidos y legales efectos, D. LUÍS MANUEL MADEIRA DE CARVALHO, Médico Veterinário, Profesor Asociado con Habilitación de Parasitología y Patología y Clínica de las Enfermedades Parasitarias en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Lisboa, Portugal, como supervisor de la estancia de investigación de D. RODRIGO BONILLA QUINTERO, Médico Veterinário y estudiante doctoral de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, certifica que lo candidato desarrolló trabajo de investigación de carácter parasitológico y serológico relativo a trematodosis animales en su laboratorio, desde el 15 de noviembre de 2013 al 15 de febrero de 2014 (tres meses), además de recibir instrucción, adiestramiento y entrenamiento sobre el diagnóstico de otras infecciones parasitarias en ganado vacuno y equino relacionadas también con la realización de sus trabajos de Tesis Doctoral.

Por lo cual firma, para que surta los efectos oportunos, en Lisboa, a 4 de septiembre 2015.



LUIS MANUEL MADEIRA DE CARVALHO
(Profesor Asociado con Habilitación)

Agradecimientos

Al GRUPO CARVAL y en especial al Dr. Oscar Robin M, por todo el apoyo incondicional y la confianza que me han brindado para realizar este trabajo.

A mis tutores, Dra. Rita Sánchez-Andrade, Dra. María Sol Arias Vázquez y Dr. Adolfo Paz Silva por su dedicación, orientación y sabios consejos; igualmente por transmitirme sus conocimientos y experiencia, pero lo más importante, su amistad.

A la Dra. Rita Sánchez-Andrade y al Dr. José Luis Suárez García de Paredes por toda su amabilidad, amistad y por compartir momentos inolvidables.

Al Dr. Luis Madeira de Carvalho y familia por brindarme su amplia amabilidad y amistad durante mi estancia en Lisboa.

Al Dr. Jorge Guerrero por su confianza, apoyo y por presentarme a este maravilloso grupo de investigación.

Los Catedráticos del Departamento de Patología Animal, Dra. M^a Patrocinio Morondo Pelayo y Dr. Pablo Díez Baños, por brindarme la oportunidad de trabajar en la Unidad de Parasitología de esta Facultad.

Los Profesores Dres. Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez y Pablo Díez Fernández, por su amable disposición y colaboración durante mi estadía en la Universidad.

Al Dr. José Luis Benedito Castellote, por su gran amabilidad, interés y confianza en este trabajo.

A mis compañeros y amigos en España, Fabián Arroyo, José Angel Hernández, Cristiana Cazpal Monteiro, Silvia Miguélez y Pablo Piñeiro por su carisma, fraternidad y colaboración.

A las Dras. Ginna Romero de CARVAL y Nidia Novoa de Hacienda Potreritos, por su colaboración, amabilidad y acompañamiento en el trabajo de campo; igualmente, al Dr. Alexander León y Andrea García del Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales por permitirme trabajar en el laboratorio y por la ayuda en la realización de las técnicas diagnósticas de coprología.

A las Dras. Linda Hayek, Carol Agudelo, Nidia Torres y Sandra Ruiz del Laboratorio ANIMED por su interés y gran apoyo para realizar este trabajo.

A todos los productores ganaderos, Médicos Veterinarios, Zootecnistas, técnicos, por su interés, colaboración en facilitarnos las fincas, los animales y proporcionarnos la información para llevar a cabo con éxito este estudio.

A toda mi familia, a mi esposa Carolina y a mi hijo Santiago por todo su amor, apoyo, paciencia, y cercanía. Todos son mi motivación.



Ilustraciones

Todas las imágenes y esquemas que contiene esta Memoria son originales y propiedad del Autor y del Grupo de Investigación COPAR (GI-2120; USC), a excepción de los mapas que se detallan a continuación, y que han sido obtenidos en páginas web de acceso libre:

Página	Leyenda	Ubicación original
3	Fig. 1. Representación de los diferentes climas de Colombia.	http://colombiaestructurada.blogspot.com.es/p/clima-y-suelo.html
4	Fig. 2. Zonas climáticas de Colombia.	http://es.slideshare.net/AlexanderVargasOrtiz/biomas-de-colombia
7	Fig. 3. Viajes de Colón a América.	http://spainillustrated.blogspot.com.es/2011/08/descubrimiento-de-america.html
	Fig. 4. Mapa político de Colombia.	http://www.lahistoriaconmapas.com/atlas/colombia-maps/imagenes-de-mapa-de-colombia.htm
11	Fig. 5. Distribución de la población ganadera en Colombia	http://atlasgeografico.net/la-ganadera-en-colombia.html
55	Fig. 22. Cuencas hidrográficas de Cundinamarca.	http://institutodeestudiosurbanos.info/endatos/0100/0120/01210.htm
59	Fig. 23. Mapa del departamento del Antioquia.	http://www.zonu.com/fullsize2/2011-08-22-14443/Mapa-de-carreteras-de-Antioquia.html
63	Fig. 24. Mapa del departamento del Meta.	http://www.didacticamultimediacr.com/EST_SOC_CR/atlas/span_htm/colom_043.htm

Respecto a las figuras incluidas en la presente Memoria, se ha seguido el criterio de numerar y proveer de leyenda sólo a aquellas que guardaban estrecha relación con el texto, y que se consideró que necesitaban de explicación adicional.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	11
1.1.- República de Colombia	3
1.2.- Ganado vacuno en Colombia	6
1.2.1. Importancia de la ganadería en Colombia	8
1.3.- Zonas productoras de ganado vacuno en Colombia.....	10
1.4.- Antecedentes de infección por trematodos en Colombia.....	11
1.4.1. En el hospedador intermediario	11
1.4.2. En el hospedador definitivo	11
1.5.- Importancia económica y sanitaria de las trematodosis bovinas en Colombia	13
1.6.- Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	14
1.7.- Ciclo biológico de los paramphistómidos.....	15
1.8.- Diagnóstico de trematodosis en Colombia.....	20
1.8.1. Mediante técnicas coprológicas.....	20
1.8.2. Mediante técnicas inmunoenzimáticas	20
1.8.3. Pruebas de campo.....	21
1.9.- Control integrado de trematodosis en ganado vacuno	23
1.9.1. Tratamiento de hospedadores definitivos.....	23
1.9.2. Acción sobre el medio	27
1.9.3. Control Biológico	28
1.9.4. Mecanismo de acción de hongos ovididas	33
1.9.5. Factores que limitan el control biológico de parásitos en bovinos	34
2.- OBJETIVOS	37
3.- SERODIAGNÓSTICO DE TREMATODOSIS BOVINAS EN COLOMBIA	41
3.1.- Toma de muestras de sangre de ganado vacuno	44
3.1.1. En el Departamento de Cundinamarca	46
3.1.2. En el Departamento de Antioquia.....	48
3.1.3. En el Departamento del Meta.....	50
3.2.- Determinación de la seroprevalencia de trematodosis bovina.....	52
3.2.1. ELISA (<i>enzyme linked-immunosorbent assay</i>).....	52
3.2.2. Procesamiento de datos.....	54

3.3.- Seroprevalencia de trematodosis en Cundinamarca.....	55
3.4.- Seroprevalencia de trematodosis en Antioquia	60
3.5.- Seroprevalencia de trematodosis en el Meta.....	64
3.6.- Análisis global de la seroprevalencia de trematodosis en Colombia.....	68
4.- RELACIÓN ENTRE EL MANEJO DEL GANADO VACUNO EN COLOMBIA Y LA SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A TREMATODOS.....	69
4.1.- Encuesta para conocer las características de manejo del ganado bovino en Cundinamarca, Antioquia y Meta	71
4.2.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de trematodosis en Cundinamarca	74
4.3.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de trematodosis en Antioquia	78
4.4.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de trematodosis en Meta	81
4.5.- Seroprevalencia de trematodosis y manejo de bovinos en Colombia	84
5.- CONTROL INTEGRADO DE LA PARAMPHISTOMIDOSIS BOVINA.....	87
5.1.- Tratamiento de hospedadores definitivos en Colombia	89
5.1.1. Diseño experimental	89
5.1.2. Resultados y Discusión	92
5.2.- Actividad de <i>Mucor circinelloides</i> sobre huevos de <i>C. daubneyi</i> en España	94
5.2.1. Propagación de esporas de <i>M. circinelloides</i>	94
5.2.2. Obtención de huevos de <i>Calicophoron daubneyi</i> (Riotorto, Lugo, España)	94
5.2.3. Ensayos para determinar la actividad ovicida de <i>Mucor circinelloides</i>	95
5.2.4. Resultados y Discusión	96
5.3.- Actividad de <i>Mucor circinelloides</i> sobre huevos de paramphistómidos en Colombia	99
5.3.1. Diseño experimental	99
5.3.2. Resultados y Discusión	99
6.- CONCLUSIONES.....	105
7.- CONCLUSIONS.....	109
8.- RESUMEN.....	113
8.- SUMMARY.....	121
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	129



The image features a large, light blue watermark of the University of Santiago de Compostela (USO) logo, which is a diamond shape containing the letters 'USO' and the text 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'.

1.- INTRODUCCIÓN



1.1.- República de Colombia

La República de Colombia está situada en la región noroccidental de América del Sur (Longitud: 74° 04' 51.30" Oeste; Latitud: 4° 35' 56.57" Norte), y organizada políticamente en 32 departamentos descentralizados y un Distrito Capital, Bogotá. El país cuenta con una superficie de 2.129.748 km².

Se trata de la cuarta nación en extensión territorial de América del Sur, y la tercera en población (en torno a 47 millones de habitantes). El producto interno bruto de paridad de poder adquisitivo de Colombia ocupa el cuarto puesto en América Latina y el puesto 28 a nivel mundial. El PIB nominal colombiano es el cuarto más grande de América Latina y ocupa el puesto 29 a nivel mundial.

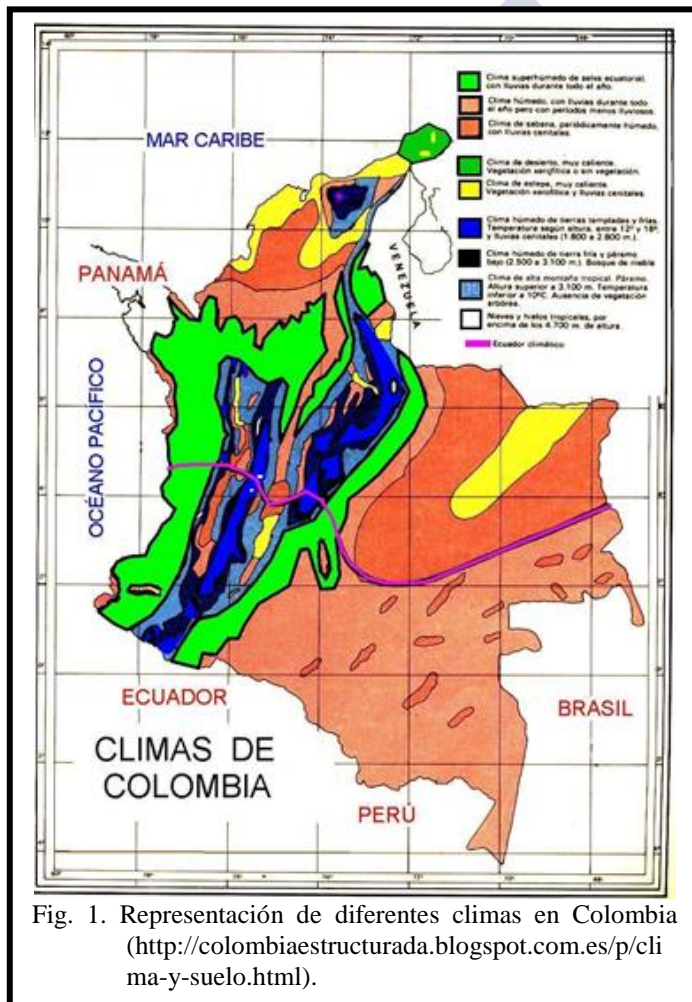


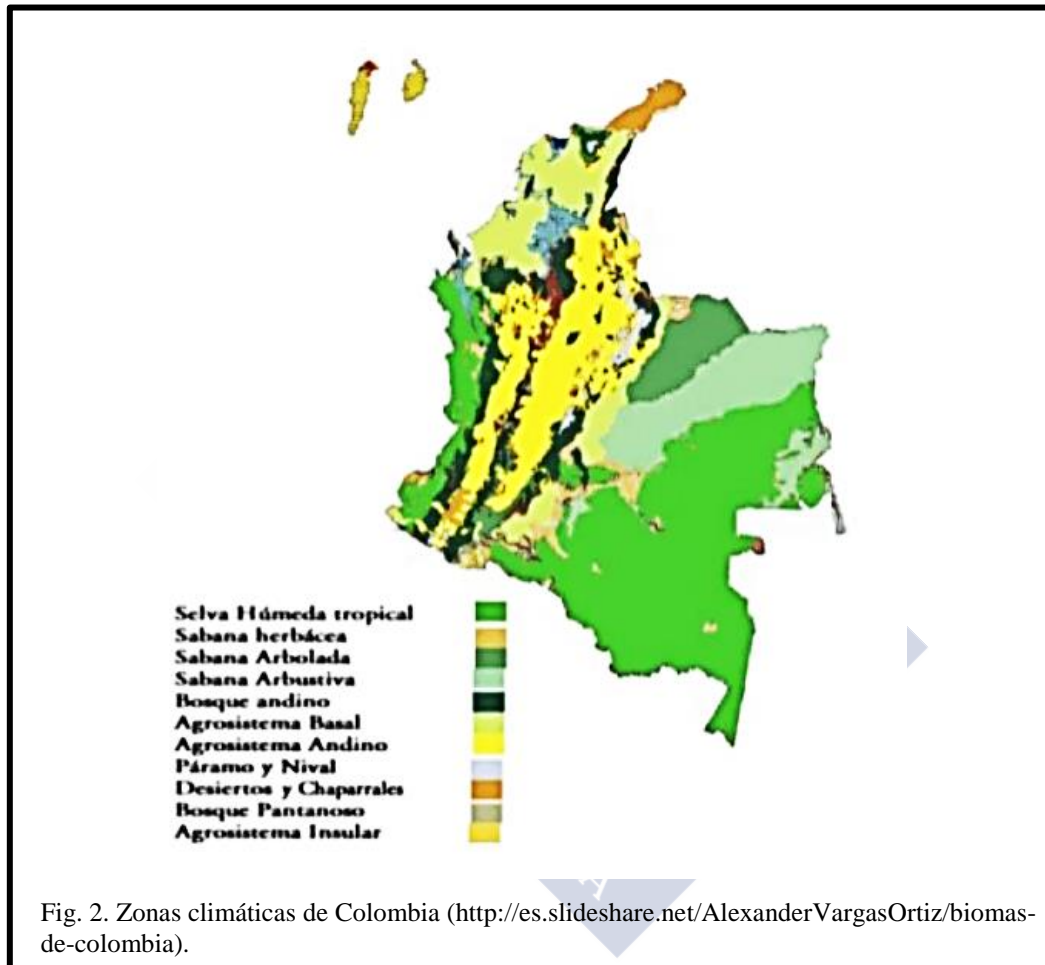
Fig. 1. Representación de diferentes climas en Colombia (<http://colombiaestructurada.blogspot.com.es/p/cli-ma-y-suelo.html>).

Colombia tiene un clima tropical característico por la importante humedad durante la mayor parte del año, y se definen diferentes zonas climáticas (Fig. 1), que se agrupan en 3: la zona tropical (tierra caliente) desde el nivel del mar hasta 1000 metros con una temperatura media anual de 24-27°C; la zona templada (tierra templada) entre 1000-2000 m, con temperatura media anual de 18°C, y la zona fría (tierra fría) por encima de 3000 metros con una temperatura media anual de 13-17°C. Resulta notable tener en cuenta que las zonas costeras tienen altas temperaturas (25-30°C), con poca estacionalidad.

El volumen anual de lluvias varía considerablemente entre las diferentes

regiones, y las precipitaciones son más intensas en la costa y en los Andes, con un máximo de 5000 mm al año. La ubicación geográfica, la presencia de las cordilleras y la influencia que tienen las corrientes continuas de aire húmedo que se originan en los océanos y en la Amazonía juegan un

papel importante en la formación de la mayor parte de las lluvias. En Colombia se presentan dos regímenes o patrones de lluvias, uno denominado *monomodal*, caracterizado por un largo periodo de lluvias que es seguido por un periodo seco, y que ocurre principalmente en las zonas Sur, Norte y Occidental del país (Alarcón y Pabón, 2013). El segundo régimen o *bimodal* se caracteriza por dos periodos lluviosos intercalados por uno seco, y se presenta sobre todo en la zona Central. Por todo ello, en la actualidad se considera que existen más zonas climáticas en Colombia (Fig. 2).



CLIMA TROPICAL DE SABANA, SEMI-HÚMEDO

Se describe en los Llanos Orientales, buena parte de la llanura del Caribe (zonas costeras), el final de las estribaciones de la cordillera Occidental (en el norte) y extensas porciones de los valles de los ríos Cauca y Magdalena, en especial en los cursos medio y bajo.

Se caracteriza por temperaturas siempre superiores a los 24°C, que fluctúan hasta los 27°C. Presenta una alternancia de época de lluvias y de sequía, que se distribuyen en periodos de seis meses. La mitad seca del año corresponde al paso de los vientos alisios del noreste.

SELVA TROPICAL HÚMEDA Y LLUVIOSA

En las selvas chocoanas del Catatumbo y las de la cuenca Amazónica; la región central del Magdalena, la Costa Pacífica, la vertiente oriental de la cordillera Oriental en su borde exterior, la serranía de Perijá, el Piedemonte llanero, los Llanos Orientales y las estribaciones de las cordilleras Occidental y Central donde comienza la llanura del Caribe poseen este clima inhóspito.

Es este uno de los climas más rigurosos, no sólo del país, sino también de la Tierra, pues en él se dan los extremos tanto de temperatura, siempre por encima de 27°C (25-30°C), como de humedad, traducida en permanentes y abundantes lluvias. Así, es posible encontrar climas muy húmedos, húmedos y secos, con precipitaciones de 750 mm por año y temperaturas superiores a los 18°C. Formados por bosques primarios (no intervenidos por el hombre). Carece de actividad agropecuaria debido a la poca fertilidad del suelo.

CLIMA TROPICAL DE ESTEPA

Las altas temperaturas, la escasa vegetación representada en pastos poco desarrollados y las precipitaciones mínimas, son las características sobresalientes del clima tropical de estepa. Participa del clima desértico durante los 5 meses de sequía.

Este clima corresponde a parte de las sabanas de Bolívar y del norte de La Guajira, a la zona central del llano (ríos Meta y Guaviare) y a las franjas altas de las cordilleras, bordeadas de montañas que impiden el paso de los vientos húmedos, y también a regiones bajas en los cañones montañosos.

Las estepas están formadas por un estrato herbáceo constituido por gramíneas que alcanzan a veces más de 1 m de altura. Estas condiciones no son homogéneas. Suelo rico en hierro, aluminio y arcilla. Son planos, extensos, profundos. Precipitaciones de 5000 mm. Se ubican en el Altiplano Cundiboyacense y en la Orinoquía.

CLIMA TROPICAL DE DESIERTO

Este es el clima de la alta Guajira, caracterizado por sus elevadas temperaturas (tierra caliente), escasas precipitaciones de sólo 802 mm anuales en promedio debido al relieve llano. Es la región menos lluviosa de Colombia (no llueve durante más de 7 meses al año), debido a su ubicación frente a los vientos alisios del noreste, que absorben la humedad ambiental y resecan la tierra porque no existen barreras montañosas dónde depositarla. Las temperaturas sobrepasan los 29°C. Se encuentra en llanuras costeras del Caribe, San Andrés y Magdalena.

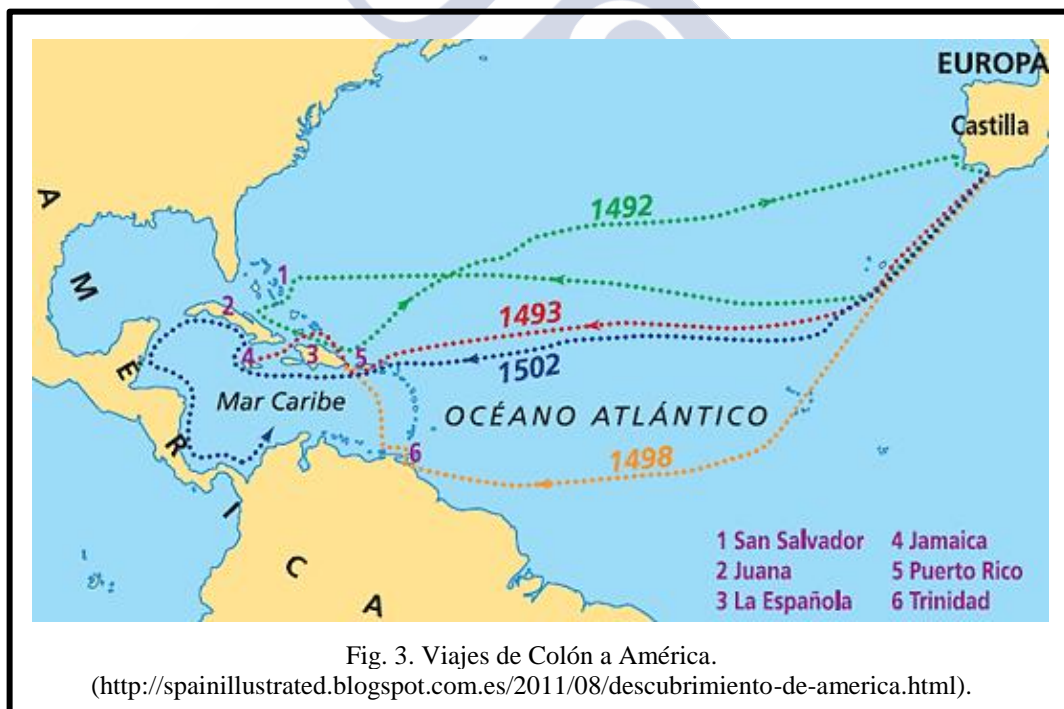
CLIMA TROPICAL DE MONTAÑA

Se describe en la región montañosa andina y en las cumbres de las cordilleras, y está determinado por la altitud. Las diferencias en el relieve dan lugar a los denominados pisos térmicos o niveles hasta los cuales predomina un tipo de clima; se distinguen cuatro pisos térmicos:

- Cálido
- Templado
- Frío
- Páramo y zonas glaciales

1.2.- Ganado vacuno en Colombia

Los primeros vacunos llegaron con el segundo viaje (1493-1496) de Colón a la isla de la Española (Fig. 3), que hoy comprende Haití y República Dominicana, y a través de Panamá pasaron a Colombia.



En 1524, Rodrigo de Bastidas obtuvo autorización real para llevar a territorio colombiano cerca de 200 vacunos, que desembarcaron en Santa Marta el 16 de Mayo de 1525. Posteriormente se transportaron bovinos a Cartagena, Santa Marta y Península de la Guajira. En estos dos últimos lugares se multiplicaron y luego iniciaron su avance hacia el interior donde encontraron condiciones favorables para su cría. En 1543 se introdujeron más bovinos desde el sur a través de Ecuador y por el oriente de Venezuela, y con estos últimos empezaron a poblarse los Llanos Orientales.



Fig. 4. Mapa político de Colombia.

(<http://www.lahistoriaconmapas.com/atlas/colombia-maps/imagenes-de-mapa-de-colombia.htm>).

A finales del siglo XVI, el ganado vacuno se expandió de las áreas del río César, Isla Mompós y Sabanas bajas cenagosas de Bolívar hacia Antioquia (Fig. 4), a las áreas que hoy forman los Santanderes, y remontando el río Magdalena al centro del país. Cuando a finales del siglo pasado

llegó la expansión cafetera, al lado del grano colonizador, el pasto y la vaca se distribuyeron por los ramales andinos de los Valles de los ríos Magdalena y Cauca.

La expansión ganadera en el Valle del Cauca la iniciaron los colonizadores que traían reses procedentes de Antioquia, Tolima, Huila y la Costa Atlántica, adaptándose y multiplicándose por el medio favorable y pastos abundantes que encontraron. Los bovinos que llegaron inicialmente pertenecían a la especie *Bos taurus*, provenientes de razas españolas como la Negra Andaluza, Blanca Pirenaica, Rubia Gallega, Berrenda Andaluza y Murciana, que mezcladas en diferentes proporciones fueron adquiriendo características y cualidades fisiológicas que se han conservado a través de muchas generaciones.

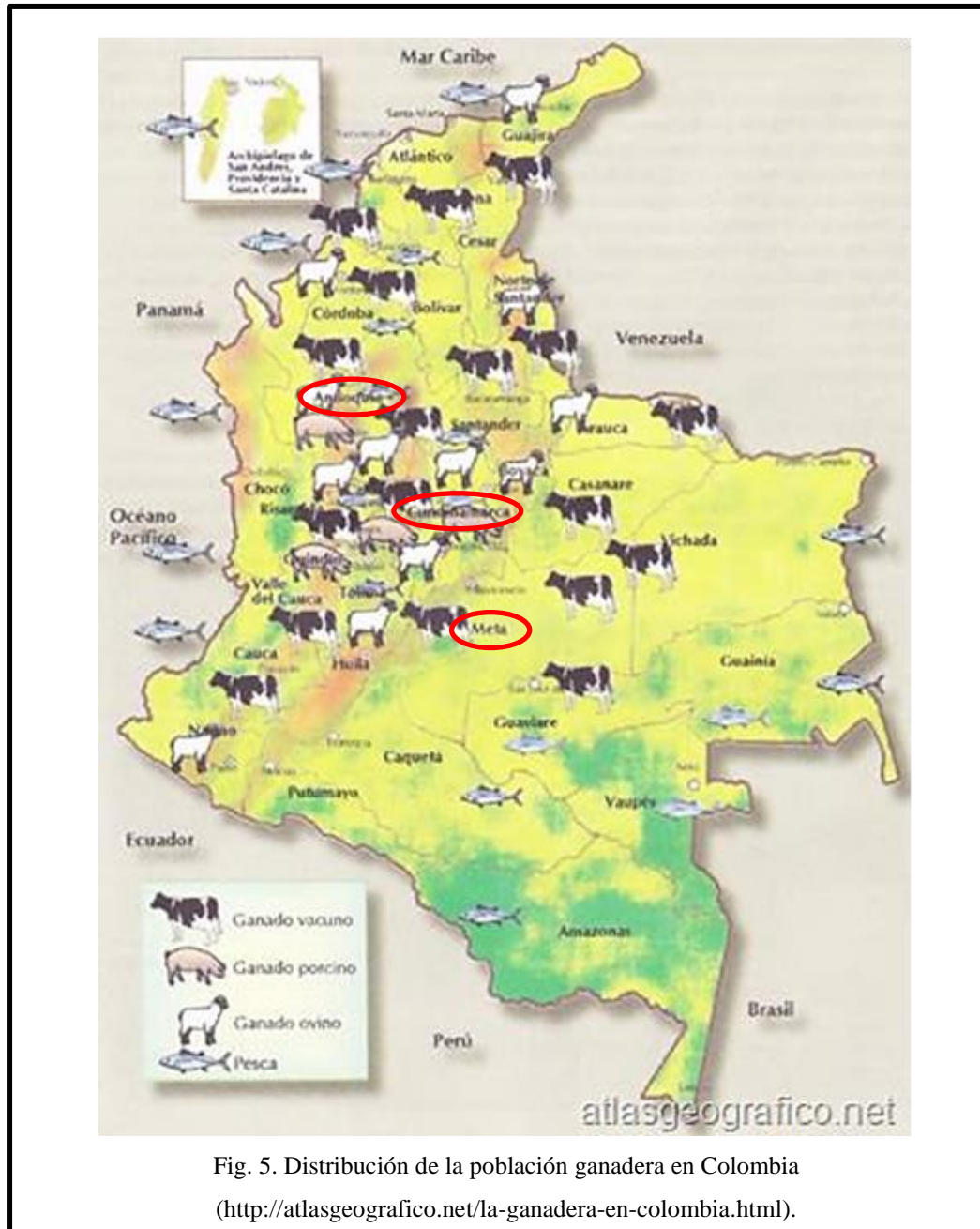
1.2.1. Importancia de la ganadería en Colombia

La producción lechera colombiana representa cerca del 1,3% del PIB nacional y 11% del PIB agropecuario, y según la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN, 2007), esta actividad genera 400.000 empleos. La ganadería tiene una especial importancia por su aporte al producto interno bruto agropecuario y a la demanda agregada a través del consumo de los hogares. Las mejoras tecnológicas y la distribución del hato entre llanura y Piedemonte que se ha producido en los últimos años, ocurre por el margen de rentabilidad que ofrecen la tendencia de los precios y consumo y la capacidad de competencia de la actividad frente a otros usos del suelo.

La población ganadera y la producción anual dependen en gran medida de la dinámica que exprese el crecimiento de los mercados terminales. El consumo determinado por los ingresos, el precio, las elasticidades ingreso y precio del producto y el comportamiento poblacional, así como el tipo de mercado competitivo con una lógica especial de formación de los precios a su interior, condicionan la evolución del subsector.

La producción de leche en Colombia es de 6,4 toneladas por año (Ministerio de Agricultura, 2005). El 34% de la producción lechera proviene de la región central del país conformada por los departamentos de Cundinamarca (Sabana de Bogotá), Boyacá, Meta y Santanderes (Roldán y cols., 2003; Martínez y cols., 2005) (Fig. 5).

El 52% de la producción nacional se obtiene de razas lecheras especializadas y el 48% restante de razas doble propósito, principalmente Pardo Suizo, Normando y cruces con Cebú. El 95% del hato ganadero en Colombia presenta algún contenido de cebú, con buena adaptación en las zonas de climas templado y cálido, y altos rendimientos en carne y leche (Roldán y cols., 2003; Martínez y cols., 2005).

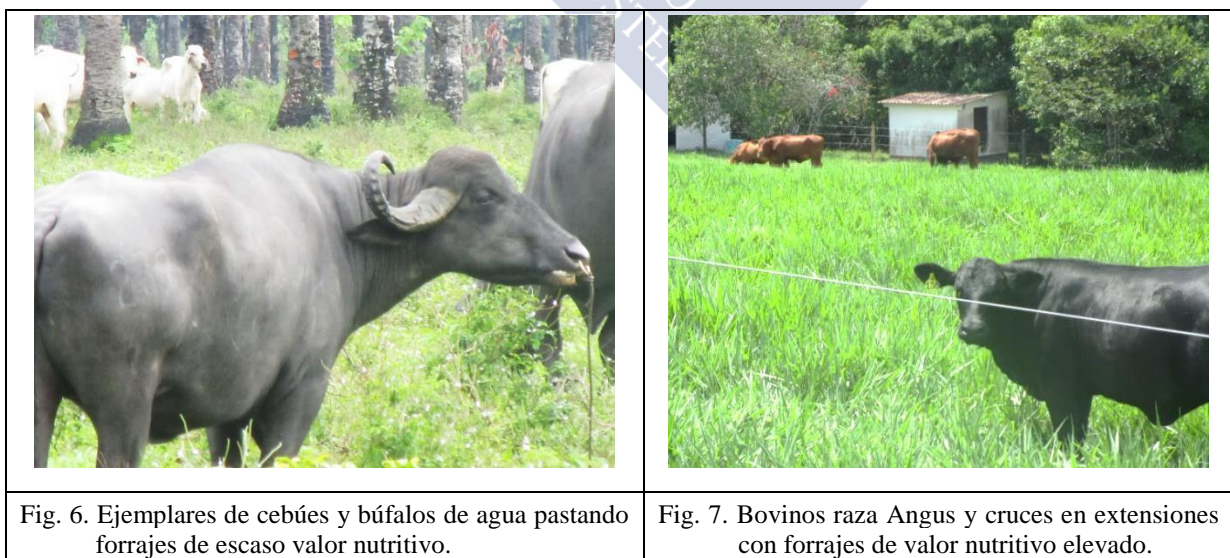


1.3.- Zonas productoras de ganado vacuno en Colombia

La ganadería vacuna para la producción de carne representa el 16% del valor de la producción agropecuaria y el 37% del pecuario. El inventario en el año 2015 fue de 22,5 millones de cabezas de ganado, de los cuales el 57,2% se destinaba a la producción de carne, 3,3% a la producción de leche, y 39,5% para el doble propósito. Se estima que el ganado vacuno pastorea 36,1 millones de hectáreas que corresponde al 57,2% de la superficie agropecuaria colombiana, con una capacidad de carga de 0,66 animales/Ha que señala la predominancia de sistemas de producción en extensivo.

Las regiones con mayor participación ganadera son la región Norte con el 28,4% y la Oriental con el 27,6% (Fig. 5), con un crecimiento general del 0,7%, cifra que supera la tasa mundial (0,4%), de los países del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (NAFTA, *North American Free Trade Agreement*) y la EU-15 (Unión Europea de 15 países), y es equivalente a la registrada por los países del hemisferio americano. Estas cifras indican un gran potencial de crecimiento en la ganadería de carne colombiana.

En algunas regiones como en los Llanos Orientales de Colombia predomina la cría de bovinos de carne bajo un sistema de explotación extensivo en las grandes sabanas, en condiciones de pastoreo con forrajes tropicales de baja calidad (Fig. 6), lo cual ocasiona bajas producciones. En los últimos años esta situación ha mejorado, y ya se pueden observar bovinos de aptitud cárnica en extensiones con forrajes de elevado valor nutritivo (Fig. 7).



1.4.- Antecedentes de infección por trematodos en Colombia

1.4.1. En el hospedador intermediario

Son varias las especies de *Lymnaea* identificadas en el país, y en opinión de algunos investigadores *Lymnaea bogotensis* es el principal hospedero intermediario de *Fasciola* en Colombia (Camargo y Camacho, 1999).

En una finca de Antioquia se corroboró la presencia de un foco de paramphistomidosis bovina, señalándose la participación de dos moluscos hospedadores en simpatría, *Lymnaea columella* y *Galba truncatula* (López y cols., 2008). Las frecuencias del paramphistómido en los caracoles permiten considerar que *G. truncatula* es el hospedador intermediario principal, y *L. columella* el hospedador intermediario alterno (Longo y cols., 2005).

1.4.2. En el hospedador definitivo

a) *Fasciola hepatica*

En Colombia se han reportado prevalencias de fasciolosis bovina de hasta del 90% mediante coprología en el valle de San Nicolás (oriente antioqueño) (Wilches y cols., 2009). En un estudio realizado por la Universidad INCCA de Colombia y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, se diagnosticó fasciolosis bovina en sus diferentes presentaciones, *parasitaria* (39,4%), *presentación de huevos en bilis y en materia fecal* (14,8%), y *adultos en conductos biliares* (32,4%). En este mismo estudio se encontró que el 43,7% de los casos positivos eran hembras y el 56,3% machos (Giraldo Pinzón y cols., 2011).

b) Paramphistómidos

En algunos estudios realizados en bovinos de los Llanos Orientales y de la costa Caribe se ha detectado la presencia de *Paramphistomum cervi*, *Cotylophoron cotylophorum* y *Cot. panamensis* (Parra y cols., 1982; Rodríguez, 1984). Existen algunos estudios que indican la infección de ovinos por *Cot. Cotylophorum* en las zona centro- y alto-andinas de Antioquia (Galvis y cols., 1984; Alarcón y Velásquez, 2009).

En áreas con alta humedad del Piedemonte Llanero y presencia de caracoles acuáticos (0-1800 m.s.n.m.) se ha detectado la presencia de *Cotylophoron* y de *Paramphistomum* (Griffiths y cols., 1986; Benavides y Romero, 2001).

Posteriormente, se describió *Cotylophoron cotylophorum* como el agente causal de paramphistomidosis en bovinos de producción cárnica de las Sabanas en el cálido Piedemonte llanero, así como en los Llanos Orientales, donde se señalaron varias especies de paramphistómidos, de los cuales falta la descripción que respalde el estatus taxonómico específico asignado en las publicaciones (Alarcón y Velásquez, 2009; López Martínez y cols., 2012).

Asimismo, se ha comprobado que *Cotylophoron panamensis* se circunscribe a Colombia, Brasil, Panamá y República Dominicana (Eduardo, 1985; Miranda y Costa, 1999), lo que sugiere el origen neotropical de la especie. Falta por establecer el reservorio silvestre, que posiblemente se trate de una especie nativa como *Hydrochaeris hydrochaeris* (chigüiro, capibara), especie ampliamente distribuida al oriente de la cordillera de los Andes, con registro de infección por *F. hepatica* en Brasil (Santarém y cols., 2006).

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo, los paramphistómidos de mayor impacto en la producción ganadera han sido asignados a los géneros *Paramphistomum*, *Cotylophoron* y *Calicophoron*. En concreto, en América se han descrito *P. cervi*, *P. leydeni* y *P. ichikawi*; *Cot. cotylophorum*, *Cot. jacksoni*, *Cot. fuelleborni*, *Cot. panamensis*, *Cot. bareilliensis*, *Cot. travassosi* y *C. microbothrioides* (Eduardo, 1985; De Araújo y Guimarães, 1992; Miranda y Costa, 1999; Torrel y Paz, 2015).

1.5.- Importancia económica y sanitaria de las trematodosis bovinas en Colombia

En las ganaderías de Colombia, principalmente en zonas lecheras de clima frío, es muy común la presentación de fasciolosis, lo que hace que en algunos casos los ganaderos apliquen fasciolocidas de manera un poco indiscriminada. Las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad están causadas por la muerte de las vacas en edad productiva (hasta el 33% de las vacas afectadas), pero la presentación más frecuente de la fasciolosis es **crónica**, originando enflaquecimiento progresivo, anemia y en consecuencia disminución en la producción y calidad láctea (Benavides y Romero 2001). En un documento de FAO para América Latina y el Caribe también se reporta una disminución en la eficiencia reproductiva, reducción en las conversiones de ingesta (entre el 8 y 28%), y la asociación de fasciolosis con otros patógenos como el *Clostridium haemolyticum* que produce la hemoglobinuria bacilar en bovinos (Olaechea, 2004).

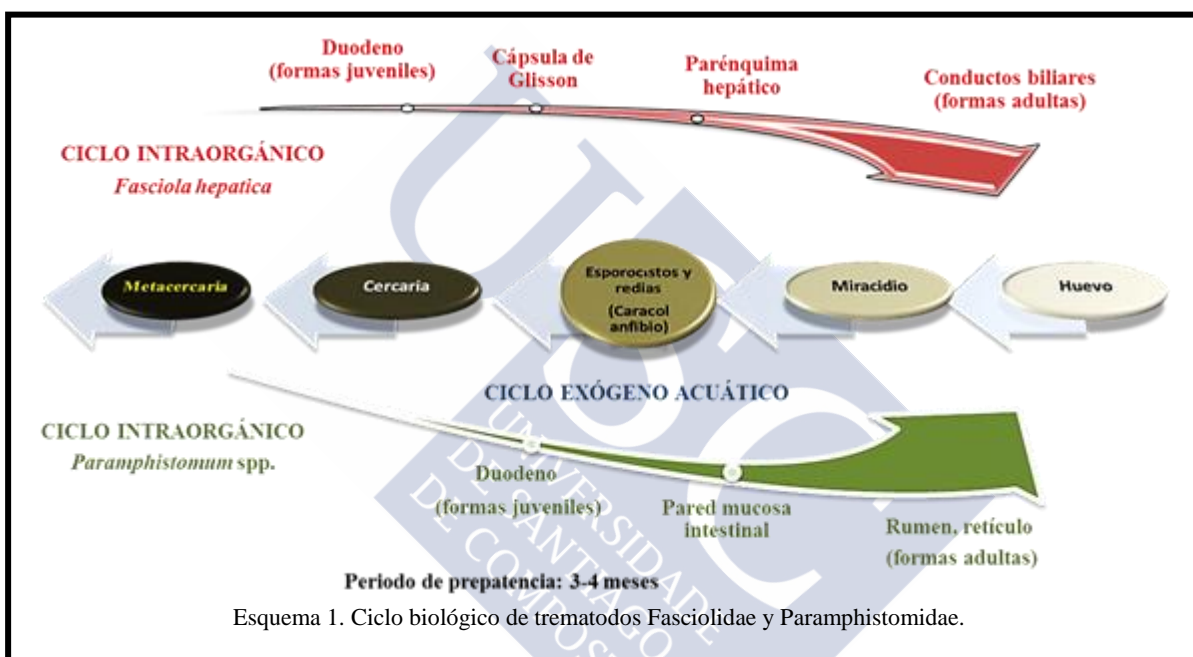
En mataderos, la detección del parásito en hígado provoca su decomiso inmediato (Benavides y Romero 2001; Cubides y cols., 2011), y además es preciso tener en cuenta que la fasciolosis es una zoonosis (Wilches y cols., 2009). La OMS ha estimado que 2,4 millones de personas están infectadas por *F. hepatica*, y otros 180 millones están en riesgo de infección (Becerra, 2001). Más de 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos en el mundo pastorean en zonas en riesgo de infección por *F. hepatica* (Olaechea, 2004). Las estimaciones mundiales de pérdidas económicas por fasciolosis son de USD \$3,2 billones / año (Spithill y cols. 1998; Hernández y cols., 2015a), y en Colombia de \$ 12.483 millones de pesos, atribuyéndose al decomiso de hígados el 9,18% (Benavides, 1996; Becerra, 2001). El alto número de bovinos infectados así como la frecuencia de los parásitos en los caracoles, evidencian la falta de estrategias para su control y el riesgo de infección por *F. hepatica* para las personas que laboran en el sector.

López y cols. (2008) indicaron que existe un elevado desconocimiento de los paramphistómidos por parte del personal que tiene a su cargo predios con vacunos.

1.6.- Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*

El ciclo biológico de este trematodo se caracteriza porque los hospedadores definitivos albergan *fasciolas adultas* en los conductos biliares hepáticos y vesícula biliar, y eliminan **huevos** que salen al exterior con la bilis a través de las heces (Rodríguez-Pérez y Hillyer, 1995) (esquema nº 1).

En localizaciones con humedad y vegetación, en el interior del huevo se desarrolla un embrión (**miracidio**) (Fig. 8), que en zonas encharcadas nada de forma activa hasta localizar al hospedador intermediario, un caracol anfíbio de la familia Lymnaeidae, en cuyo interior se completan las fases de **esporocisto**, **redia** y **cercaria** (Fig. 9) (Rojo-Vázquez y cols., 2012).





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

Es importante destacar que las condiciones climáticas que concurren en algunas regiones de Colombia, como en la Sabana, son adecuadas para el desarrollo de la fase exógena de este parásito. Thomas en Inglaterra (Oxford) y Leuckart en Alemania (Leipzig) publicaron una serie de documentos (1881-1883) en los que describían que *Galba (Lymnaea) truncatula* era el hospedador intermediario de *F. hepatica* en Europa (Pantelouris, 1965). Desde entonces, numerosas especies de caracoles de agua dulce de la familia Lymnaeidae (*Gastropoda: Basommatophora*) han sido señalados como hospedadores intermediarios.

1.7.- Ciclo biológico de los paramphistómidos.

La paramphistomidosis es una trematodosis causada por parásitos de la familia Paramphistomidae, que se caracterizan morfológicamente por la presencia de una ventosa ventral o acetábulo en el extremo posterior, y su forma cónica (Alarcón y Velásquez, 2009).

La fase exógena del ciclo biológico es idéntica a la de *F. hepatica*, y de hecho comparten hospedadores intermediarios, principalmente caracoles del género *Lymnaea* (Abrous y cols., 1997; Gómez y Pérez, 2006). La diferencia estriba en la fase endógena (esquema nº 1): una vez ingeridas, las metacercarias se desenquistan en el lumen intestinal y se introducen en la mucosa y submucosa,

desde donde inician una migración retrógrada hasta alcanzar el rumen y el retículo. En estas localizaciones se fijan a la mucosa y se desarrollan hasta adultos, que completarán el ciclo mediante la eliminación de huevos que salen al exterior con las heces (Abrous y cols., 2000). Es importante destacar que en ocasiones no resulta fácil diferenciar los huevos de los dos trematodos según su coloración (Fig. 10), lo que puede conducir a un diagnóstico incorrecto (Mage y cols., 2002).

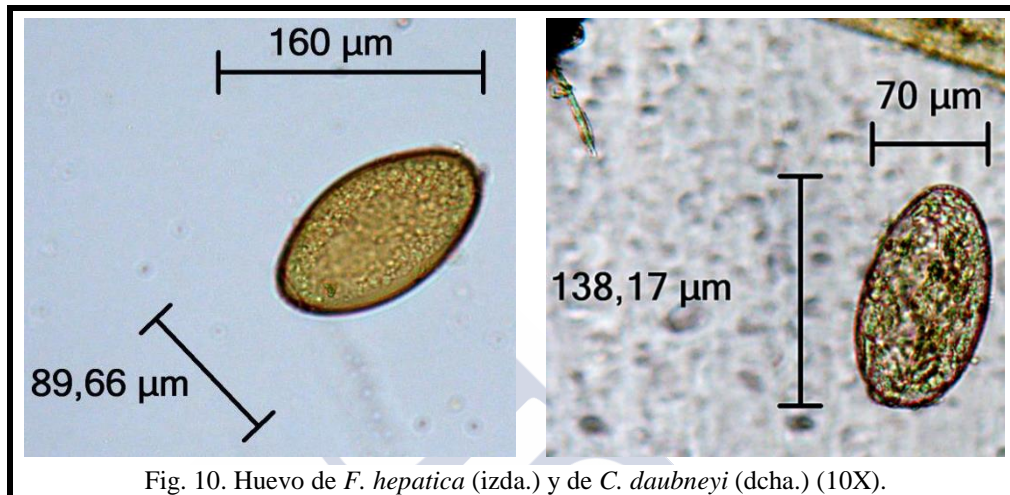


Fig. 10. Huevo de *F. hepatica* (izda.) y de *C. daubneyi* (dcha.) (10X).

Otro criterio útil para el diagnóstico diferencial de los huevos de ambos trematodos consiste en observar la posición del cigoto, que en los amphistómidos adopta una localización medio-posterior (Fig. 11) y en *Fasciola* medio-anterior (Torrel y Paz, 2015).

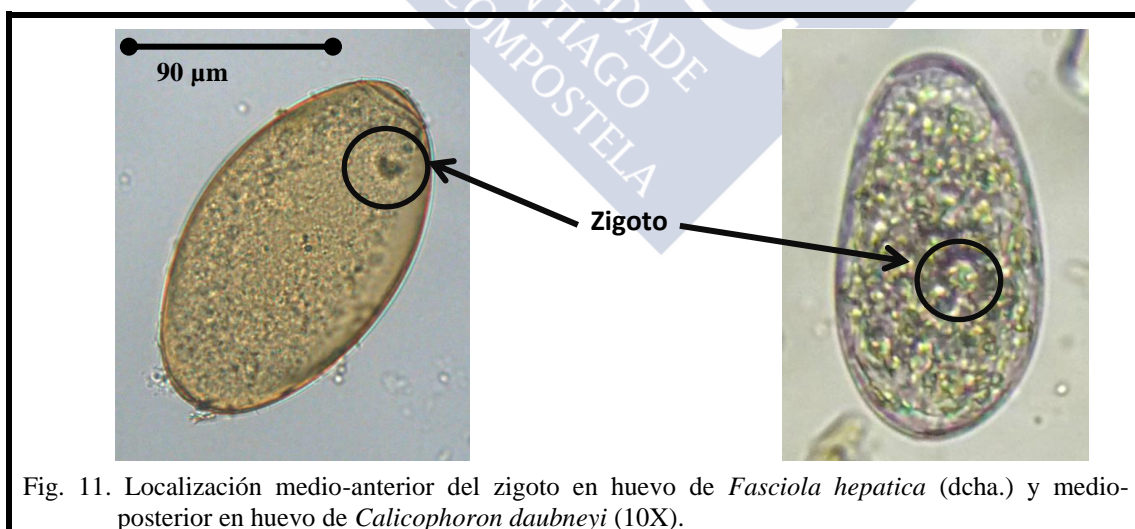


Fig. 11. Localización medio-anterior del cigoto en huevo de *Fasciola hepatica* (dcha.) y medio-posterior en huevo de *Calicophoron daubneyi* (10X).

El número de investigaciones que se han desarrollado en Colombia sobre la paramphistomidosis es reducido. La organización mundial de la salud (OMS) define las enfermedades emergentes como aquellas *nuevas enfermedades producidas por agentes no identificados anteriormente, causantes de*

problemas de salud pública. En este contexto **nueva** no implica desconocida hasta la fecha, sino que en los últimos años se ha mejorado el conocimiento de su extensión y gravedad. Una definición más precisa podría ser la de *enfermedad de etiología infecciosa, por lo general epizootica, con carácter epidémico, e incidencia mayor en los últimos 20 años, que afecta a diversas poblaciones de riesgo*.

En los últimos años se ha diagnosticado en diferentes países europeos (Italia, Francia, España, Reino Unido, Irlanda), americanos (México, Argentina, Colombia, Uruguay) y asiáticos, en los que la prevalencia de paramphistomosis ha alcanzado valores del 11-40% (Rangel-Ruiz y cols., 2003; Pfukenyi y cols., 2005; Murphy y cols., 2008; Sanabria y Romero, 2008; Alarcón y Velásquez, 2009; Dorny y cols., 2011; Sanchís y cols., 2013; Gordon y cols., 2013; Titi y cols., 2014; Khedri y cols., 2015). En Francia, durante el periodo 1990-1999, la prevalencia de paramphistomosis pasó del 5,2% al 44,7%, en tanto que la de fasciolosis no experimentó variaciones (Szmidt-Adjidé y cols., 2000; Mage y cols., 2002). Arias y cols. (2010, 2011) indicaron que tras un periodo de 10 años en el que se administraron fasciolicidas de forma muy frecuente, en Galicia (región situada en el noroeste de España) no disminuyó la prevalencia de esta trematodosis. Precisamente la administración de tratamientos fasciolicidas para el control de infecciones por paramphistómidos se ha sugerido como una de las posibles causas responsables del incremento la paramphistomosis bovina, dado que el desconocimiento de esta trematodosis conduce a un diagnóstico erróneo y de este modo a un tratamiento ineficaz, puesto que no está muy extendida la utilización de productos de acción amphistomicida (Mage y Reynald, 1990).



Fig. 12. Paramphistómidos adultos en la mucosa ruminal de bovinos sacrificados en un matadero de Bogotá (DC, Colombia).

Los paramphistomos afectan con mayor frecuencia a rumiantes jóvenes (terneros, cabritillos y corderos), y existe evidencia de que los trematodos juveniles son especialmente patógenos, porque durante la migración retrógrada desde el intestino al rumen dan lugar a un cuadro de inflamación que se traduce en alteraciones digestivas y hemáticas, que a veces pueden incluso provocar la muerte de los animales (Silvestre y cols., 2000; Rangel-Ruiz y cols., 2003). Pese a que se ha discutido el rol virulento de las formas adultas, recientemente se han descrito alteraciones de las papilas ruminales (en especial en el atrio) causadas por amphistómidos adultos, que consistían en adelgazamiento y desprendimiento de las mismas, desarrollo de acantosis-hiperqueratosis, que redundan en la productividad de los rumiantes (Mavenyengwa y cols., 2005; Malrait y cols., 2015; Fuertes y cols., 2015).

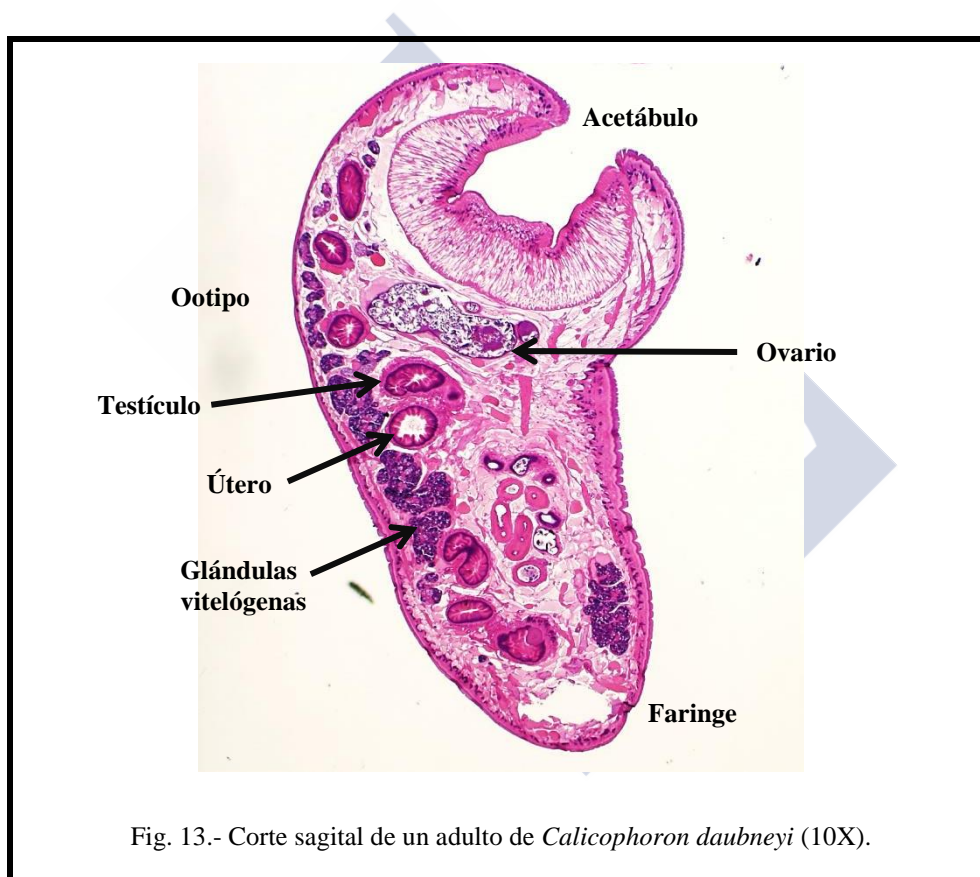


Fig. 13.- Corte sagital de un adulto de *Calicophoron daubneyi* (10X).

Se ha demostrado que *Paramphistomum* y *Cotylophoron* producen grandes pérdidas económicas al disminuir la conversión alimenticia, pérdida de peso corporal y bajar la producción de leche (Mavenyengwa y cols., 2010). En general la paranfistomosis suele cursar como una enteritis hemorrágica más importante sobre rumiantes jóvenes (terneros, cabritillos y corderos), a los que ocasionan alteraciones digestivas y hemáticas que pueden llegar a provocarles la muerte. Existe evidencia de que estas alteraciones se deben principalmente a los trematodos juveniles, y persisten

incluso cuando las formas adultas alcanzaron su localización definitiva. A pesar de que en opinión de algunos investigadores no está del todo clara la patogenicidad de las formas adultas, se ha señalado que producen atrofia y cornificación de las papilas ruminales (Fuertes y cols., 2015). Los anfishómidos adultos también llevan a cabo una acción expoliadora del fluido ruminal, en especial sobre lípidos y ácidos grasos (Ghosh y Misra, 2011).

No existen demasiados estudios sobre el impacto económico de la parafistomosis bovina, probablemente debido a su carácter emergente que se plasma en el desconocimiento de esta trematodosis y a la insuficiente atención que se le presta. En bovinos infectados de forma experimental se comprobó una reducción en la ganancia de peso del 5-9%, lo que supone alrededor de 6-8 Kg menos de peso en el sacrificio comparado con el grupo de bovinos no infectado. Asimismo, el porcentaje de hembras gestantes en la 1ª inseminación artificial aumentó desde un 38% hasta un 66% después de la desparasitación (Hernández y cols., 2015a).

Apenas existen datos sobre la importancia de fasciolosis y paramphistomosis bovina en Colombia. Los procedimientos más empleados a tal efecto consisten en la inspección postmortem de animales sacrificados en matadero, o en pruebas *in vivo* como la coprología. De este modo se establece un diagnóstico tardío, ya que han tenido lugar la mayoría de las lesiones causadas por la migración a través del parénquima. Se ha mencionado la escasa notoriedad que, hasta la fecha, ha alcanzado la infección por amphistómidos, sin duda causada por la ausencia de información.

1.8.- Diagnóstico de trematodosis en Colombia

1.8.1. Mediante técnicas coprológicas

La detección de huevos de trematodos se lleva a cabo por la técnica de sedimentación de Dennis (Aguirre y cols., 1998), en la que se pesan 3 g de materia fecal y se homogeneizan en 50 mL de solución detergente al 5 por 1000 en un vaso de precipitado. Después de sedimentar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se eliminan las 2/3 partes del sobrenadante y se añaden de nuevo 5 mL de solución

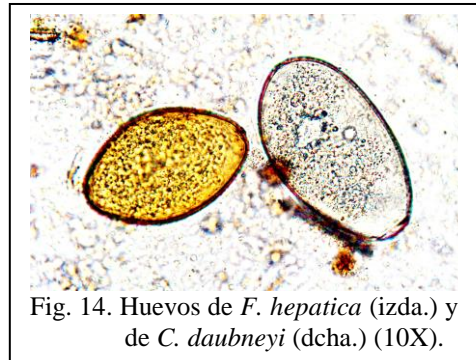


Fig. 14. Huevos de *F. hepatica* (izda.) y de *C. daubneyi* (dcha.) (10X).

detergente. Transcurridos otros 15 minutos, se retiran las 2/3 partes, y se añade solución salina al 0,9% hasta completar un volumen de 50 mL, que se deja sedimentar durante otro periodo de 15 minutos. El paso siguiente consiste en eliminar el sobrenadante hasta dejar 10 mL, sedimentar durante 10 minutos, y finalmente colocar en una placa Petri para observar al microscopio bajo aumento de 4X-10X. Finalmente, se detecta la presencia o ausencia de huevos de trematodos, como los que se aprecian en la Figura 14.

Apenas existen publicaciones acerca del diagnóstico de fasciolosis que aludan a esta técnica coprológica. En Colombia, la prevalencia de infección por *F. hepatica* se estimó en un 20-25% en las ganaderías de leche de clima frío del país tales como Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Norte de Santander, y se presenta con menos frecuencia en algunas zonas de Antioquia, el viejo Caldas, Cauca, Valle del Cauca, Tolima, Huila y Meta (Orozco y cols., 1996).

1.8.2. Mediante técnicas inmunoenzimáticas

El diagnóstico de fasciolosis conlleva habitualmente la identificación de huevos de *Fasciola* en materia fecal, que si bien es patognomónico para la presencia del parásito presenta una sensibilidad de 74%, menor que la obtenida al realizar los métodos de inmunodiagnóstico. Se ha señalado que un ELISA con una proteína recombinante del tegumento del trematodo (FhrAPS) proporciona una sensibilidad del 86% y una especificidad del 88% (Arias y cols., 2010), lo que confirma que el serodiagnóstico de la fasciolosis representa una alternativa útil y fiable (Sanchís, 2015).

Otras pruebas entrañan un protocolo más complicado, como es el caso de los inmunoensayos de captura para la detección de anticuerpos, o los ELISAs sándwich para poner en evidencia los antígenos circulantes que liberan algunos parásitos en el hospedador (Mezo y cols., 2007).

Aunque las técnicas de inmunodiagnóstico hacen posible la detección precoz de las trematodosis, y el análisis de un número elevado de muestras al mismo tiempo, presentan algunos inconvenientes como la obtención de antígenos en cantidades suficientes siempre que sea necesario, la posible existencia de inmunidad cruzada frente a antígenos de diferentes parásitos, o la dificultad de comparar los resultados de laboratorios de diferentes localizaciones (países) (Charlier y cols., 2009; Arias y cols., 2011).

1.8.3. Pruebas de campo

Son más bien escasas las pruebas de campo en las que se establecen las condiciones de manejo de los bovinos en Colombia. En un estudio llevado a cabo en explotaciones de Cundinamarca, se comprobó que el agua se administraba a los animales a través de acueductos (46%), nacederos (25,3%), quebradas (7,3%), pozos (6%), aljibes (4%) y vallados (2%).

El manejo de excretas demostró que en el 69,3% realizan su esparcimiento en las praderas, no hacen ningún manejo de excretas en el 28%, y sólo el 1% tienen estercolero.

A nivel de desparasitación los productos utilizados en el 42% corresponden al grupo de los Albendazoles, Levamisol (30,7%) e Ivermectina (13%).

En cuanto al tipo de pasto presente en los predios, el 60,7% tienen Kikuyo, combinación de Kikuyo y Raigrass (14,7%), Kikuyo-Raigrass y Carretón (8%), Kikuyo-Carretón (6%), Kikuyo-Avena y Kikuyo-Falsa Poa (2,7%), Kikuyo-Avena-Maralfalfa y Kikuyo-Aromática (2%) respectivamente y Kikuyo-Dátil (0,7%).

En el manejo de los pastos sobresale que no se realizan ninguna práctica de manejo (41%), se utilizan abonos (24%) y se realizan fumigaciones (20%). El tipo de pastoreo aplicado en todas las fincas es de tipo rotacional (100%) (Cabra y Herrera, 2007).

En esta encuesta también se comprobó que la asistencia técnica es prestada por médicos veterinarios particulares (19%) y por la UMATA (Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria) (49%), en tanto que no la hay el 32% de los predios.

En cuanto a la frecuencia de desparasitación, en el 15,3% se realiza cada 3 meses, en el 48,7% cada 6 meses, y durante el postparto en el 26%.



1.9.- Control integrado de trematodosis en ganado vacuno

El control eficaz de las trematodosis precisa de un programa integrado diseñado y ejecutado de forma adecuada, en el que habría que incluir la aplicación estratégica de antihelmínticos para eliminar los trematodos de los hospedadores definitivos y prevenir la contaminación del ambiente, la reducción del número de caracoles hospedadores intermediarios, y finalmente la disminución del riesgo de infección durante el pastoreo.

1.9.1. Tratamiento de hospedadores definitivos

Para evitar la utilización excesiva de antiparasitarios, se ha postulado la **terapia selectiva**, basada en la desparasitación de aquellos animales que exceden un determinado valor de eliminación fecal de huevos. Posteriormente, se ha intentado completar este concepto, apoyándose en la probabilidad de que concurren una serie de condiciones que favorezcan la aparición de las trematodosis. Se han descrito algunos **tratamientos estratégicos** en diferentes regiones, basados en patrones climáticos, que deberían complementarse con datos epidemiológicos. A tal efecto, se definen dos principios fundamentales basados en la aplicación **profiláctica** y **curativa** de antiparasitarios. La aplicación **profiláctica** se orientaría al tratamiento de los animales al finalizar el periodo de actividad reducida de los trematodos (desarrollo de miracidios en los huevos) y sus hospedadores intermediarios, de modo que las estaciones secas o extremadamente frías parecen ser las más adecuadas. Con estas medidas se conseguiría limitar la contaminación del medio antes de que las condiciones climáticas favorezcan de nuevo el desarrollo de la fase externa del ciclo biológico.

La desparasitación **curativa** tendría que administrarse uno o dos meses después del pico de infección de los rumiantes, para eliminar la población parasitaria originada tras la ingestión de metacercarias que sobrevivieron en el suelo.

En ambos casos se requiere del conocimiento de la epidemiología (en relación con el ciclo) de los trematodos en las áreas en las que se encuentran los animales (Waller, 2006). La administración de trematocidas debería tomar en consideración algunos aspectos como la disponibilidad de los fármacos, precio y balance económico de la explotación. En base a estos razonamientos, se vuelve necesario aplicar un mayor número de tratamientos con antiparasitarios eficaces sólo frente a formas adultas, que si se emplea otro activo también frente a formas inmaduras, pero evidentemente hay que considerar el costo (Stear y cols., 2007).

Más recientemente, se ha propuesto incluir aspectos como la valoración de la condición corporal de los animales, estado de salud, índices de reproducción o productividad, para establecer la necesidad de la administración de trematocidas (Dorny y cols., 2011; Charlier y cols., 2012b; Sivajothi y Reddy, 2014), y se conoce como **tratamiento selectivo estratégico**.

Se dispone de un número importante de antiparasitarios, en especial fasciolicidas, que se administran de forma mayoritaria por vía oral (Tabla 1). Una encuesta desarrollada entre agricultores irlandeses refleja una situación que se repite en la mayoría de países europeos y americanos (Bloemhoff y cols., 2014). En base a este estudio, en la mayoría de los casos (95%) se aplica sólo un fasciolicida al inicio del período seco, sin tener en cuenta la eficacia del producto utilizado (formas recién desenquistadas / inmaduras / adultas). Una tercera parte de los ganaderos utilizan Triclabendazol, el único principio activo eficaz contra estadios inmaduros y adultos de *F. hepatica* (Fairweather y Boray, 1999).

Tabla 1.- Antiparasitarios con acción trematocida de uso frecuente.			
Principio activo	Nombre comercial	Diana	Estadio
BENCIMIDAZOLES			
Albendazol	Albendaziven (100 g) Albendex (100 g)	<i>Fasciola</i>	Adultos
Triclabendazol	Fasinex (100 g) Tribex (100 g) Saguaymic (100 g)	<i>Fasciola</i>	Juveniles Adultos
SALICILANILIDAS			
Closantel	Closan-Jet (150 g) Endoex (50 g) Flukiver (50 g)	<i>Fasciola</i> <i>Paramphistomum</i>	Adultos
Oxiclozanida	Oxizan (34 g)	<i>Fasciola</i> <i>Paramphistomum</i>	Adultos
Las cantidades se refieren a un volumen de 1 L			

Algunos antihelmínticos como Albendazol u Oxiclozanida presentan una eficacia elevada frente a fasciolas adultas, y menor frente a las juveniles, por lo que se recomienda administrar 2 tomas a un intervalo de 15 días (Suárez y cols., 2013). En algunos países se ha prohibido el uso de Rafoxanida, Closantel, Nitroxynil y Clorsulon debido a la ausencia de valores para el límite máximo de residuo en leche (O'Brien y cols., 2010). Esta medida beneficiosa para la salud humana, ha supuesto el incremento en la aplicación de Oxiclozanida y Albendazol, que en un futuro no lejano posiblemente provocará la aparición de cepas resistentes a estos antihelmínticos (Charlier y cols., 2009).

Entre los planes de la Unión Europea figura una estrategia para reducir el número de antiparasitarios disponibles, por lo que la situación descrita podría llegar a agravarse. Antes de implementar este tipo de medidas, se debería realizar un análisis del riesgo de los cambios de licencia. También se debería hacer hincapié en la necesidad de controles periódicos de los patrones de uso antihelmíntico, y utilizar materiales educativos específicos para veterinarios y ganaderos que promuevan el uso eficiente y sostenible de terapia profiláctica (Cooper y cols., 2012).

Ciertos trematocidas son eficaces frente a fasciolas inmaduras y adultas, y otros contra *Fasciola* y paramphistómidos. La vía de administración oral no resulta de fácil aplicación en el caso de bovinos en extensivo, o dedicados a la producción de carne. También es necesario tener en cuenta que los bovinos pueden sufrir poliparasitismo, no sólo por helmintos sino también por ectoparásitos. Por este motivo, en los últimos años se ha llegado a la conclusión de la necesidad de combinar diferentes moléculas con acción frente a distintos parásitos (Hutchinson y cols., 2009; Martínez-Valladares y cols., 2010, 2014; EMA, 2014). Estos productos generalmente se administran por vía parenteral o tópica, aunque existen algunas preparaciones orales (Tabla 2). El objetivo es conseguir un efecto antiparasitario más amplio y que la desparasitación resulte más sencilla. Es interesante destacar que todas estas combinaciones se aconsejan para el tratamiento frente a *Fasciola* y nematodos gastrointestinales, y en algunos casos de ectoparasitosis, pero no se hace referencia a la actividad frente a trematodos gástricos. Resulta notable que todas las sinergias de antiparasitarios ofrecen un efecto fasciolicida dirigido a las formas inmaduras o juveniles y adultas del trematodo.

A pesar de todo lo reseñado, y de disponer de una amplia gama de antihelmínticos, el control óptimo de las infecciones por trematodos sigue siendo un reto (Bloemhoff y cols., 2014). Atendiendo a la demanda de alimentos sanos (leche, carne) que no contengan residuos de antiparasitarios metabolizados por los animales, junto con el objetivo de reducir el coste de producción, cada vez existe mayor conciencia de la necesidad de reducir el empleo de parasiticidas convencionales, y de incorporar otras medidas sostenibles que se recogen bajo el epígrafe de **control biológico**. En México se analizó el efecto de los extractos de 20 plantas sobre metacercarias recién desenquistadas, y se obtuvo una eficacia del 100% con *Tilia mexicana*, *Coffea arabica* y *Ternstroemia pringlei*, y del 95-100% con *Eriobotrya japonica* y *Crataegus mexicana* (Vera-Montenegro y cols., 2009).

Tabla 2.- Formulaciones más novedosas de antiparasitarios de acción trematocida.			
Principio activo	Nombre comercial	Formulación	Supresión
Closantel (200 g) + IVM (5 g)	Closamectin	<i>Inyectable</i>	N L / 28 C
Clorsulon (100 g) + IVM (10g)	Ivomec Plus Virbamec Plus	<i>Inyectable</i>	N L / 49 C 14 L / 28 C / 42 E
Nitroxynil (340 g) + Clorsulon (67 g) + IVM (6,7 g)	Nitromec	<i>Inyectable</i>	N L / 56 C / 120 E
Triclabendazol (200 g) + Abamectina (5 g)	Genesis Ultra Avomec Plus	<i>Pour on</i>	91 L / 91 / C N L / 49 C / 140 E
Triclabendazol (200 g) + MOX (5 g)	Cydectin Plus Fluke Cydectin TriclaMox	<i>Pour on</i>	84 L / 84 C N L / 143 C
Triclabendazol (300 g) + IVM (5 g)	Fasimec Pour On	<i>Pour on</i>	N L / 49 C / 140 E
Triclabendazol (240 g) + IVM (1,5 g) + Dietilelinglicol monobutil éter	Sovereign	<i>Pour on</i>	N L / 28 C / 70 E
Triclabendazol (120 g) + IVM (2g)	Fasimec Oral	<i>Oral</i>	28 L / 21 C / 56 E
Triclabendazol (120 g) + IVM (2 g) + Oxiclozanida (150 g)	Fasicomectina plus	<i>Oral Intrarruminal</i>	N L / 30 C
Las cantidades se refieren a un volumen de 1 L. N.L.: no administrar a vacuno de leche L: período de supresión (días) en vacuno de leche; C: en bovino de carne; E: exportación			

En otra investigación realizada también en México, se procesaron las hojas de 20 plantas para obtener sus extractos, y los mejores resultados frente a fasciolas adultas se consiguieron con *Castela tortuosa* (chaparro amargo), *Achillea millefolium* (Plumajillo), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Justicia spicigera* (muicle), *Limpia critridora* (cedrón), *Populus alba* (Alamo), *Mentha piperita* (menta), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo), *Lippia graveolens* (orégano), *Artemisia mexicana* (estafiate) y *Artemisia absinthium* (ajenjo) (Ibarra-Moreno y cols., 2012). Investigaciones posteriores señalan el efecto beneficioso que se obtiene mediante la suplementación de ovejas con vitamina E (Martínez-Pérez y cols., 2014).

1.9.2. Acción sobre el medio

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

Al mismo tiempo, se aconseja destruir el hábitat que propicia la supervivencia de los hospedadores intermediarios en los pastos mediante sistemas de drenaje, pero al igual que en el caso anterior, el costo de esta medida hace que no se aplique de forma rutinaria. Una medida acertada podría consistir en la instalación de bebederos que no estén en contacto con el suelo, mediante los cuales se proporcione agua potable a los animales.

Distintos estudios plantean que el control resultaría eficaz destruyendo **los hospedadores intermediarios** así como los **diferentes estadios de los trematodos en el medio** (miracidios, cercarias y metacercarias) (De Carvalho y cols., 1998; Rug y Ruppei, 2000; Naples y cols., 2005; Iannacone y cols., 2008).

Hasta hace unas décadas, uno de los procedimientos más utilizados para la destrucción de los caracoles era el empleo de cal viva (cianamida cálcica) sobre los prados en los que se sospechaba o tenía la certeza que los bovinos adquirirían la infección. Esta medida proporcionó excelentes resultados porque al efecto molusquicida, se añadía el beneficio de la corrección del pH de los suelos ácidos. Sin embargo dejó de aplicarse porque conlleva la destrucción indiscriminada de todos los caracoles e insectos. Idénticas razones llevaron a descartar el empleo de la niclosamida, salicilanilida de elevada eficacia molusquicida (Henderson y Triebskorn, 2002; Cringoli y Rinaldi, 2013).

Ante esta situación, se consideró la posibilidad de emplear productos naturales con acción molusquicida, aislándose más de 70 productos de plantas activos frente a caracoles (Marston y Hostettman, 1985). Se obtuvieron muy buenos resultados con extractos de *Carica papaya* y *Areca catechu*, observándose que las concentraciones que provocan la eliminación de los caracoles no son tóxicas para peces, como *Colisa fasciatus*, que comparte el mismo hábitat con el caracol *Lymnaea acuminata* (Jaiswal y Singh, 2009).

En Cuba se comprobó *in vitro* que el extracto de *Momordica charantia*, conocida vulgarmente como “melón amargo o cundiamor”, tiene efectos letales sobre *Fossaria cubensis*, hospedador intermediario de *Fasciola*, señalándose la necesidad de extender y profundizar este estudio en condiciones naturales para conocer el impacto ecológico que produciría el extracto vegetal (Diéguez y cols., 2012).

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

Para destruir las fases del parásito que se encuentran en el ambiente, se han descrito extractos vegetales con propiedades ovicidas (De Carvalho y cols., 1998), miracidicidas (Vinaud y cols., 2005) y cercaricidas (Naples y cols., 2005). Recientemente se ha comprobado que algunos hongos del suelo destruyen los huevos de trematodos como *F. hepatica* o *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) (Dias y cols., 2012; Piñeiro y cols., 2012; Cortiñas y cols., 2015).

1.9.3. Control Biológico

Se han descrito diferentes procedimientos para el control biológico de parásitos de animales en pastoreo, fundamentados en el manejo de animales y pastizales. Entre estos figuran la rotación de pastos, dejando transcurrir tiempo suficiente para que se destruyan las formas de los parásitos (huevos y larvas) antes de que el ganado vuelva a entrar en las parcelas; otra posibilidad consiste en la roturación y arado de los prados. Estas medidas son muy eficaces y acertadas, pero pueden complicar en cierto grado las tareas a realizar por los cuidadores de los animales. Existe un problema que deriva de la presencia de la materia fecal en los pastos, en la que pueden sobrevivir las formas de diseminación de parásitos protozoos, trematodos, cestodos o nematodos.

La fitoterapia y la homeopatía son alternativas poco conocidas para el control parasitario. Existen plantas que se utilizan como vermífugos (ajo, artemisia, enebro común) que favorecen la expulsión de los parásitos de los animales al estimular el tránsito intestinal. Con el empleo de forraje a base de ciertas plantas (lotus, sulla, achicoria) se destruyen las larvas de los parásitos intestinales del ganado por su alto contenido en taninos. Algunos estudios defienden la utilización de especies vegetales con alto contenido en taninos, por su efecto sobre la respuesta inmunitaria de los animales. Desde el punto de vista agronómico, se trata de especies de cultivo un tanto complicado, con importante variabilidad estacional, y precio considerable. Otro inconveniente surge de que la producción de algunas de las especies indicadas está circunscrita a determinadas condiciones ambientales que favorecen su crecimiento, de modo que no se ha solucionado por ahora la obtención a gran escala. También existe cierto grado de sospecha de que su presencia en la dieta de los rumiantes podría reducir la ingestión y digestibilidad de los alimentos. Se desconoce si la ingestión de estas plantas en grandes cantidades pueda generar residuos que lleguen a la cadena alimentaria; también es preciso adaptar la legislación y especificar qué prácticas están permitidas y quién debe ser el responsable de aplicar estos tratamientos. En algunos países nórdicos la homeopatía no puede ser aplicada por veterinarios porque no se considera una práctica con base científica.

Diferentes estudios han investigado la utilización de partículas de alambre de óxido de cobre en ovejas y cabras, pero en bovinos casi no se han empleado. No se conoce con exactitud el mecanismo de acción, pero algunas investigaciones apuntan que se produce un efecto directo sobre los parásitos, y otras que se estimula el sistema inmunitario.

Otra posibilidad consiste en la administración a los animales de diatomitas, rocas sedimentarias silíceas formadas por micro-fósiles de diatomeas, que provocan la muerte de los nematodos debido a su elevado contenido en sílice (a nivel digestivo o provocando deshidratación tras fijarse a su cuerpo).

Un aspecto importante a tener en cuenta es el manejo de estiércoles sólidos y líquidos, que se convierten en excelentes vehículos para la transmisión de formas parasitarias en el caso de que no sean sometidos a condiciones de fermentación que destruyan quistes, huevos, larvas... de parásitos. El **control biológico** se definió en 1980 en un seminario patrocinado conjuntamente por la Comunidad Económica Europea (CEE), el *Nacional Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) y la *Occupational Safety and Health Association* (OSHA) (Berlin y cols., 1984), y celebrado en Luxemburgo, como la “*determinación y evaluación de los agentes o de sus metabolitos presentes en*

tejidos, secreciones, excretas, aire respirado o cualquier combinación de los mismos con objeto de evaluar la exposición y el riesgo para la salud en comparación con una referencia adecuada”, y trata de garantizar que la presencia, exposición o infección de ciertos agentes no alcance niveles nocivos (Arias y cols., 2015a).

Organismos del suelo

En la actualidad cobra fuerza el interés por disponer de medidas ecológicas selectivas, basadas en el empleo de organismos del suelo, capaces de destruir los parásitos sin afectar a microorganismos que intervienen en la fertilización del suelo. Los organismos vivos que forman parte del suelo se agrupan en **macrobiota** (lombrices, raíces de plantas), **mesobiota** (nematodos, gusanos) y **microbiota** (microorganismos como algas, bacterias, hongos, protozoos), que participan activamente en todos los procesos metabólicos que tienen lugar en el suelo, afectando directamente a su calidad y estructura (Paz-Silva, 2015).

Además de organismos beneficiosos, en el suelo se encuentran otros perjudiciales para especies vegetales y animales, como algunos parásitos (principalmente helmintos). En condiciones naturales estos organismos nocivos son controlados por algunos componentes de la microbiota telúrica (bacterias, hongos, ácaros), que de este modo evitan su propagación descontrolada y con ello la alteración de la mesobiota y macrobiota (Hernández y cols., 2015b). Por este motivo se ha intentado profundizar en el conocimiento de algunos agentes de control biológico, sobre todo con actividad frente a fitonematodos, con el propósito de aplicarlos en actividades agrícolas.

Desde hace algunos años se ha estudiado la utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control parasitario de nematodos gastrointestinales en animales que se encuentran en pastoreo, por su capacidad para eliminar los estadios adultos y juveniles gracias a la producción de una serie de cristales, que se solubilizan al ser digeridos por los nematodos y dan lugar a protoxinas, que alteran su membrana intestinal.

Se han hecho grandes progresos en el aislamiento y propagación de algunas especies de hongos saprofitos que resultan inocuos para personas, plantas y animales, y que desarrollan actividad parasiticida frente a diferentes estadios parasitarios. Se trata de una herramienta sostenible, ya que los hongos sólo se desarrollan en presencia de parásitos en el suelo (Arias y cols., 2015a). Estudios recientes descartan la actividad de hongos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* sobre las larvas de nematodos de vida libre (Saumell y cols., 2015).

Hongos parasitoidas

Los hongos son organismos eucariotas sin cloroplastos, por tanto con nutrición heterótrofa. Realizan la digestión externa de los alimentos, secretan enzimas y absorben las moléculas resultantes. La mayoría de los que viven en el suelo son saprófitos y cumplen un papel muy importante porque al descomponer materia orgánica muerta, limpian la superficie terrestre y proporcionan alimento a otros seres vivos.

Algunos de estos hongos tienen actividad ovicida, fenómeno biológico muy interesante que se está aplicando para el control de parásitos (Braga y cols., 2011). Su condición de saprófitos les permite sobrevivir durante largos periodos de tiempo en suelos en ausencia de formas parasitarias (Saumell y cols., 2015).

Las especies más conocidas son *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys flagrans*, *Monacrosporium* spp., *Pochonia chlamydosporia*, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma* spp., *Verticillium* spp. y *Paecilomyces* spp. Es importante destacar que todos estos hongos son INOCUOS para los mamíferos, como se desprende de su empleo en el cultivo de hortalizas, frutas. Se alimentan de materia orgánica del suelo, salvo cuando detectan estadios parasitarios en sus proximidades, que provocan su transformación en organismos predadores; en ausencia de formas parasitarias, retornan a un comportamiento saprofítico (Hernández y cols., 2015b). Esta característica resulta de indudable interés porque acrecienta el equilibrio mencionado anteriormente en el suelo: si existen formas parasitarias estos hongos incrementan su desarrollo porque encuentran aporte extra de Carbono y Nitrógeno, en tanto que cuando no existen, permanecen en estado de latencia (ahorro energético).

El conocimiento de hongos de actividad helmintocida frente a nematodos de especies vegetales data de más de un siglo, en que se observaron en algunos cultivos hortícolas (tomate, lechuga, espárragos, pimientos, zanahorias), y se constató que su presencia se correlacionaba con la reducción de nematodos de los géneros *Meloydogine*, *Heterodera*, *Ditylonchus*, *Pratylenchus* y *Tylenchus*, muy frecuentes en cultivos de tomates, papas, frutales, soya, etc. (Barron, 1977). Al observarse que aumentaba la presencia de estos hongos si se aplicaba abono orgánico (estiércol) procedentes de animales de producción, en un principio se consideró que la materia orgánica era la que estimulaba el desarrollo de estos hongos. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que la presencia de larvas de nematodos parásitos presentes en las heces de los animales constituía el verdadero estímulo para *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* o *Monacrosporium*, en tanto que los quistes o huevos lo eran para *Pochonia* o *Paecilomyces*.

Hongos parasiticidas de interés veterinario: control sostenible

La mayoría de los parásitos que infectan a animales de producción intercalan una fase exógena en su ciclo biológico, y estadios como ooquistes, huevos, larvas o quistes encuentran en el ambiente el hábitat adecuado para su desarrollo. Después de completar esta fase se convierten en infectivos para los animales que las ingieren durante el pastoreo, causándoles diferentes infecciones.

Arthrobotrys, *Duddingtonia* y *Monacrosporium*, en presencia de larvas de nematodos en el suelo, desarrollan hifas con las que forman trampas que retienen las larvas de nematodos y finalmente son destruidas. Por ello resultan ideales cuando en el medio se encuentra *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* o *Cyathostomum* (Mendoza de Giviesy cols., 1998; Fitz-Aranda y cols., 2015).

Pochonia, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Verticillium* son hongos endoparásitos cuyas hifas colonizan la superficie de huevos de los parásitos, se introducen en ellos y destruyen los embriones (Dias y cols., 2013). Son muy eficaces frente a parásitos cuyas larvas no abandonan el huevo cuando están en el suelo, como los nematodos *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Parascaris equorum*, *Trichuris* spp., y los trematodos *Fasciola hepatica*, *Paramphistomum* spp. (Maciel y cols., 2012; Araujo y cols., 2012). Debe tenerse en cuenta que con los hongos parasiticidas se consigue un efecto preventivo, pero no actúan sobre los parásitos alojados en los animales, por lo que primero sería necesario aplicar un antiparasitario convencional y eliminar la carga parasitaria en los animales.

Estos hongos son oportunistas y atacan únicamente algunos estadios del ciclo de vida de parásitos como los huevos y quistes por medio de terminaciones hifales (Saumell y cols., 2015). Liberan quitinasas que son enzimas inducibles que catalizan la quitina, componente de los huevos de nematodos. Los huevos infectados muestran áreas de baja densidad electrónica alrededor de las estructuras de infección (*appresorios*) y penetración de las hifas, lo que sugiere la acción de enzimas hidrolíticas (Braga y cols., 2013).

El grupo COPAR ha aislado e identificado varios hongos de interés, con marcado efecto ovicida (Arias y cols., 2013a). Los resultados obtenidos *in vitro* han sido exitosos, mostrándose estas cepas útiles para destruir huevos de trematodos (Piñeiro y cols., 2012; Cortiñas y cols., 2015) y de ascáridos (Cazapal-Monteiro y cols., 2015). Como se explicará a continuación, la exposición de los huevos de estos parásitos a hongos ovicidas induce el crecimiento de las hifas a su alrededor, que finalmente son capaces de penetrar la cubierta de los huevos y por lo tanto éstos dejan de ser viables (interfieren en la formación de las larvas en su interior).

1.9.4. Mecanismo de acción de hongos ovicidas

Se describen cuatro etapas en la actividad ovicida que estos hongos desarrollan sobre los huevos de parásitos: a) Contacto b) Adhesión c) Penetración d) Deliberación



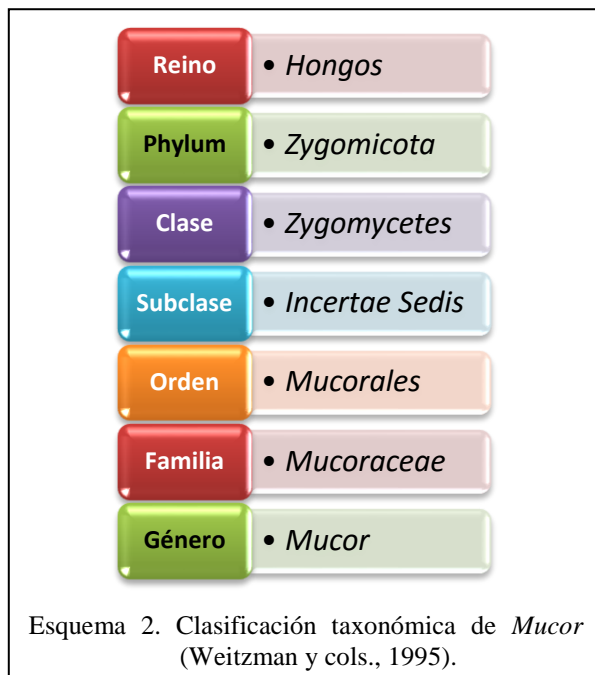
Fig. 16. Mecanismo de acción de hongos ovicidas (20X).

Cuando el hongo detecta la presencia de huevos de nematodos, se desarrollan hifas a partir de las esporas.

En los extremos de algunas hifas laterales se originan modificaciones cortas que dan lugar a órganos de fijación denominados *appresorio*, con el que los hongos entran en contacto con la cubierta del huevo y se adhieren al mismo. Sólo aquellas hifas que logran adherirse en posición más perpendicular a la cubierta penetran al interior del huevo (Brunori y cols., 1985). Algunos autores destacan la liberación de ciertas enzimas además de la participación del *appresorio* (Stirling y cols., 1979; Lýsek y Krajčí, 1987).

Después de penetrar, las hifas siguen creciendo. Las cubiertas se mantienen intactas durante algún tiempo, excepto en los puntos de penetración. Dentro del huevo, el hongo comienza a ramificarse rápidamente y destruye de forma gradual el contenido, incluyendo el embrión en desarrollo. Este proceso de ramificación sucede primero en el espacio entre la cubierta y la superficie del embrión, pero en seguida rodea al embrión mediante redes densas de hifas y finalmente lo destruye.

Al agotarse los nutrientes, las hifas regresan al espacio externo y continúan colonizando otros huevos (deliberación) (Lýsek y Stërba, 1991).

Mucor circinelloides

Es un hongo facultativo del suelo, saprófito y oportunista, que actúa principalmente sobre estados sedentarios (huevos y quistes) de parásitos (Cazapal-Monteiro y cols., 2015). Cuando se detecta su presencia en el suelo, se desarrollan hifas hacia el huevo y lo colonizan. Pueden transcurrir 7-10 días para que el hongo dañe los huevos y el número de huevos infectados aumenta progresivamente después de unas semanas. Sin embargo, la duración del proceso completo hasta la destrucción total del huevo está condicionado por la especie del parásito (Fernández y Saumell, 2012).

A diferencia de otros hongos parasitoides como *Duddingtonia flagrans* (larvicida) o *Pochonia chlamydosporia* (ovicida), no se encuentra muy extendido el empleo de *M. circinelloides* (Cortiñas y cols., 2015).

1.9.5. Factores que limitan el control biológico de parásitos en bovinos

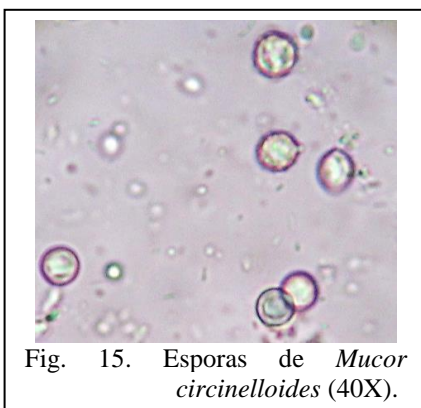


Fig. 15. Esporas de *Mucor circinelloides* (40X).

Se pueden dividir en 3 grupos: eficacia, distribución y aspectos legales. Se necesitan más investigaciones para demostrar el efecto de hongos que se van aislando en diferentes países. En la actualidad existe suficiente información acerca de *Duddingtonia* y *Pochonia*, pero se requiere de mayor conocimiento de la actividad de otras especies como *Trichoderma* o *Mucor*, e incluso de *Verticillium*. La ausencia de datos sobre diferentes hongos conduce en numerosos casos a la búsqueda de cepas

regionales de especies ya contrastadas.

La distribución de los hongos es un factor que limita su aplicación práctica. Gran parte de los datos acerca de la eficacia parasiticida se han obtenido en estudios in vitro; en los ensayos de campo con animales la administración de esporas de los hongos se ha realizado en soluciones acuosas, o en pellets elaborados de forma manual. Recientemente algunos estudios han demostrado la posibilidad de fabricar concentrados comerciales con esporas de hongos, lo que sin duda facilitaría la distribución de los hongos sin añadir un trabajo extra a los cuidadores de animales (Hernández y cols., 2015c; Arias y cols., 2015b; Arroyo y cols., 2016). Otra posibilidad pasaría por incluir las esporas en bloques minerales, o en el agua de bebida (Sagüés y cols., 2011).

Quizás el último obstáculo en la actualidad está representado por los requisitos legales que impiden en la mayoría de los países el empleo de esporas de hongos en animales de producción. Es necesario destacar que algunos de los hongos mencionados se han aislado de las heces de animales domésticos y salvajes, e incluso de muestras de pastos donde se mantienen estos animales, lo que corrobora por un lado su inocuidad, y por otro, pone de manifiesto que pueden ser ingeridos de forma natural (Hernández y cols., 2015a; Arias y cols., 2015a).





2.- OBJETIVOS





Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, se planteó un estudio para adquirir información actualizada acerca del riesgo de trematodosis por *Fasciola hepatica* y paramphistómidos en ganado vacuno de Colombia, y de las posibilidades de control, que se articuló en torno a los siguientes

OBJETIVOS:

- 1.- Determinar el riesgo de exposición a *Fasciola hepatica* y paramphistómidos en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Meta, en base al estudio de la seroprevalencia de estas trematodosis.**
- 2.- Identificar las condiciones de manejo del ganado vacuno y su posible relación con la exposición a trematodos *Fasciola* y Paramphistomidae.**
- 3.- Estimar la utilidad de un protocolo de control integrado frente a trematodosis hepáticas y ruminales del ganado vacuno.**





3.- SERODIAGNÓSTICO DE TREMATODOSIS BOVINAS EN COLOMBIA



El presente estudio se desarrolló con ganado bovino de Colombia, en concreto de los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Meta. En la Tabla 3 se presenta el censo de ganado bovino en los diferentes departamentos de Colombia en el año 2015 (ICA, 2015).

Tabla 3.- Distribución del ganado bovino de Colombia según los departamentos.			
DEPARTAMENTO	TOTAL BOVINOS	DEPARTAMENTO	TOTAL BOVINOS
Amazonas	1442	Huila	423554
Antioquia	2535479	La Guajira	312014
Arauca	1059000	Magdalena	1238017
Atlántico	229744	Meta	1662000
Bolívar	884297	Nariño	373421
Boyacá	754999	Norte-Santander	434257
Caldas	363548	Putumayo	192165
Caquetá	1304403	Quindío	77896
Casanare	1900000	Risaralda	99913
Cauca	263497	San Andrés	1002
César	1418675	Santander	1416644
Choco	163027	Sucre	836615
Córdoba	1903913	Tolima	599711
Cundinamarca	1068386	Valle	470035
Distrito-capital	26699	Vaupés	1430
Guainía	5000	Vichada	228000
Guaviare	279000		

3.1.- Toma de muestras de sangre de ganado vacuno

Se estimó la seroprevalencia de fasciolosis y paramphistomidosis mediante sendas pruebas inmunoenzimáticas ELISA. Para ello, se recogieron muestras individuales de sangre que se procesaron para establecer la presencia de anticuerpos IgG frente a la proteína recombinante del tegumento de *F. hepatica* FhrAPS (Arias y cols., 2010), y también frente al complejo proteico CdP1 obtenido tras la purificación de antígenos de excreción/secreción de *C. daubneyi* por cromatografía líquida (Francisco, 2007; Paz-Silva y cols., 2010; Bonilla, 2013).

Todas las explotaciones poseen un sistema de manejo similar en cuanto al pastoreo y rotación de praderas: normalmente dividen el terreno en varios potreros formando un cuadrado y en el centro se encuentra el bebedero (Fig. 17), de tal manera que sin importar en qué potrero se encuentren las vacas, tienen acceso al agua a voluntad; la rotación de la pradera la hacen cada 30-35 días, en algunas fincas van moviendo la cerca eléctrica de acuerdo al consumo, así se evita mayor pérdida por pisoteo y estiércol, y las vacas van comiendo ordenadamente; en la mayoría de los predios de la sabana de Bogotá se mantienen en pastoreo de 1 a 3 vacas / Ha.

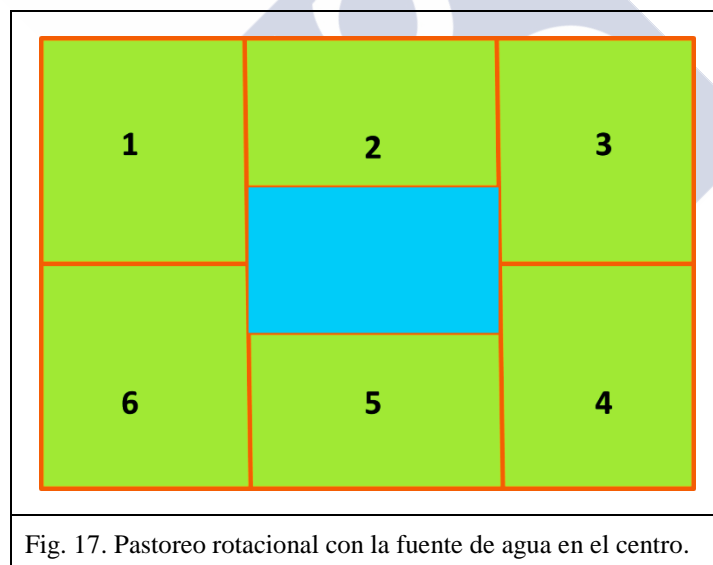


Fig. 17. Pastoreo rotacional con la fuente de agua en el centro.

En cuanto a los sistemas de ordeño, son pocas las fincas en las que se utilizan salas de ordeño, por las que pasan las vacas 2 veces / día (Fig. 18), y de acuerdo a la producción se le suministra una ración de concentrado u otro suplemento. En gran parte de las explotaciones se utiliza ordeño mecánico en potrero (Fig. 19), mediante sistemas que se alimentan con generadores portátiles de electricidad (plantas eléctricas) (Bonilla, 2013).



Fig. 18.- Sala de ordeño de vacuno Holstein (Cundinamarca, Colombia).



Fig. 19.- Ordeño mecánico de vacuno Holstein (Cundinamarca, Colombia).

Existen diferentes formas para administrarles el agua de bebida, como pozos, nacederos, aljibes, vallados, acueductos o ríos (Bonilla y cols., 2015) (Fig. 20). Los vallados o caños se refieren a canales anchos y profundos, naturales o artificiales, que se practican en el suelo con el fin de retener aguas de escorrentía, lluvias y de drenaje; el acueducto se refiere al sistema de servicio público veredal o municipal, que lleva el agua hasta las fincas. Es frecuente la utilización de sistemas de drenaje en las fincas donde siempre hay agua acumulada en los potreros y que se encuentran ubicadas en zonas inundables.



Fig. 20.- Imagen de vallados o caños (izda.) y de nacederos (dcha.), que proporcionan agua a los bovinos de Colombia en pastoreo.

3.1.1. En el Departamento de Cundinamarca



El departamento de **Cundinamarca** cuenta con 116 municipios ubicados alrededor de los 2.600 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), en su mayoría de topografía plana, con piso térmico frío y una temperatura promedio de 13°C. En este departamento se encuentra la **Sabana de Bogotá**, formada por 30 municipios, localizada en el centro de Colombia, sobre la cordillera oriental de Los Andes. Forma parte del altiplano cundiboyacense, que como indica su nombre está compuesto por los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Se trata de una región de tradición

lechera, aunque también produce gran cantidad de papa, hortalizas y flores.

Se describen diferentes climas en Cundinamarca, pero los más importantes son **Cfb** y **Csb**. El clima *oceánico* o **Cfb** se caracteriza por temperaturas suaves y precipitaciones abundantes, con inviernos fríos y veranos frescos, con una oscilación térmica anual pequeña (promedio de 10°C). En España se registra en Galicia, cornisa Cantábrica y norte de Castilla (Arias y cols., 2011).

El clima **Csb** (*mediterráneo de verano cálido*) constituye una transición entre el oceánico **Cfb** y el mediterráneo **Csa**, que explica la aparición de sequía estival aun siendo oceánico. De temperaturas suaves que no exceden los 27°C y precipitaciones abundantes la mayor parte del año (en general inferiores a 1000 mm).

De un censo de 22.527.783 bovinos en Colombia, el 4,74% se encuentra en Cundinamarca (ICA, 2015). La ganadería es de lechería especializada, se adaptan muy bien las razas Holstein, Jersey, Pardo Suizo y Ayrshire, que se mantienen en un sistema de pastoreo que comprende la rotación de praderas compuestas por *Kikuyo* (*Pennisetum clandestinum*) y *Rye Grass* (*Lolium perenne*), en las que se emplean sistemas de riego y fertilizantes. En la cuenca lechera de la sabana de Bogotá la productividad promedio por animal es de 14 L / día (Roldán y cols., 2003; Martínez y cols., 2005), de los cuales la sabana de Bogotá aporta 900.000 toneladas / año (FEDEGÁN, 2007).

a) Muestra

Entre los meses de agosto de 2012 y mayo de 2013 se visitaron 30 explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera en 17 municipios de la región de la Sabana de Bogotá (Colombia), en las que se recogieron un total de 374 de muestras de heces y sangre de bovinos Holstein. Las praderas que servían de alimento a los rumiantes tenían una extensión de ($\bar{x} = 145 \pm 417$), compuestas como ya se ha indicado



por *Kikuyo* (*Pennisetum clandestinum*), *Rye Grass* (*Lolium perenne*) y otras especies forrajeras; en épocas de sequía se les suministra heno, henolaje o ensilaje de diferentes cultivos. El agua de bebida es proporcionada principalmente mediante pozos (30%), acueductos (20%) o nacederos y vallados (17%).

En algunas fincas (17%) se recoge la materia fecal de los potreros y establos, para depositarlas en estercoleros.

La mitad de los predios visitados se encuentran en terrenos inundables, con caños permanentes (87%) y provistos de sistemas de drenaje (83%). Tan sólo el 47% de los encuestados afirmaron haber observado caracoles anfibios en sus propiedades.

Todos los cuidadores del ganado conocían la infección por *Fasciola hepatica*, considerándola de importancia moderada-grave (80%). Sin embargo, antes de la realización del presente estudio únicamente 2 explotaciones habían presentado diagnósticos positivos, y el 20% señalaron remitir muestras de heces al laboratorio para conocer el estado de infección de los rumiantes antes de la administración de tratamiento antiparasitario.

En base al criterio de profesionales veterinarios (77%), se aplican fenbendazol + raxofanida (27%), clorsulon (23%) o eprinomectina (13%), al momento del secado y del parto (40%). Para la dosificación se estima visualmente el peso de los bovinos (80%), y la rotación de principios activos no está muy extendida (33%). La eficacia del tratamiento se analiza en el 10% de las explotaciones.

Se emplea el nitroxinil en casos esporádicos, para el tratamiento sintomático de fasciolosis (aparición de edema submandibular).

3.1.2. En el Departamento de Antioquia

El departamento de **Antioquia** se encuentra al noroeste del país. Ocupa un territorio de 63.612 km² que limita al norte con el mar Caribe y el departamento de Córdoba; al occidente con el Chocó; al oriente con Bolívar, Santander y Boyacá; y al sur con Caldas y Risaralda. Es el 6º departamento más extenso del país y el más poblado, teniendo en cuenta que el distrito capital de Bogotá es una entidad administrativa especial. Su organización territorial comprende nueve subregiones y la capital es Medellín.



Los climas descritos con mayor frecuencia son **Af** y **Cfb**. En las áreas **Af** o de *clima ecuatorial* se registran temperaturas elevadas y prácticamente constantes durante todo el año (media >27°C), con una amplitud inferior a 3°C. Las precipitaciones son abundantes y regulares, por encima de 1500-2000 mm. Este clima se encuentra en los países que bordean el ecuador, destacando la cuenca del Amazonas (América del Sur), la cuenca del Congo, la costa del golfo de Guinea (África) y el sureste asiático.

La población de este departamento se cifra en torno a 6.456.207 personas en un total de 125 municipios. Más de la mitad de la población reside en el área metropolitana del Valle de Aburrá. Su economía genera el 13% del PIB colombiano, en segundo lugar tras Bogotá.

La ganadería ha tenido un desarrollo notable desde el último cuarto del siglo XX, sobresaliendo las variedades de ganado bovino que últimamente incluyen la raza Angus-Brangus (cruce de cebú Brahman y Angus). El censo bovino representa el 11,25% del total nacional. Este departamento lidera la producción nacional de leche, y alberga la cooperativa lechera más grande de Latinoamérica, COLANTA®.

a) Muestra



Entre los meses de agosto y octubre de 2013 se visitaron 20 explotaciones de ganado vacuno de 6 municipios del departamento de Antioquia (Colombia), en las que se recogieron un total de 341 de muestras de sangre de bovinos de aptitud cárnica (*Bos Taurus*, Brangus) y láctea (Holstein).

Se trataba de explotaciones de hasta 150 Ha ($\bar{x} = 145 \pm 417$) de superficie de pastoreo (mayoritariamente compuesto por *Kikuyo -Pennisetum clandestinum-* y *Rye Grass -Lolium perenne-*), en las que el agua de bebida de los bovinos procedía de pozos. El porcentaje de granjas en las que los animales se alimentaban únicamente en los pastos, sin recibir forraje cortado en otros prados, fue del 82%, y en el 55% se realizaban operaciones para eliminar el estiércol de la zona de pastoreo, que consistían en acumularlo en un “estercolero”, o bien emplearlo para fertilizar otras extensiones como fincas dedicadas a la producción de cítricos. En el 50% se describió la presencia de caños permanentes, y pese a que en el 30% existían sistemas de drenaje, el 85% de los encuestados afirmaron que los predios se inundaban con cierta frecuencia.

Sólo se observaron caracoles en el 20% de las fincas, y aunque el 95% de los encuestados tienen conocimiento sobre *Fasciola hepatica*, ninguno de ellos consideró que constituyese un problema grave para la ganadería vacuna, y el 70% le asigna una importancia moderada.

Todas las explotaciones cuentan con asistencia técnica veterinaria y realizan control parasitario, pero tan sólo el 15% encargan análisis coprológicos antes de la aplicación de un tratamiento, bien indicado por el profesional veterinario (50%) o siguiendo la experiencia propia (45%).

La administración de albendazol (solo o en combinación con fenbendazol, ivermectina o eprinomectina) una o dos veces al año constituye la pauta de tratamiento más frecuente, calculándose la dosis en función de la estimación visual del peso de los rumiantes. Todos los cuidadores observan rotaciones de antiparasitarios, y tratan a todos los animales al mismo tiempo. Tan sólo en el 15% de los casos se evalúa la eficacia del tratamiento.

3.1.3. En el Departamento del Meta

Se ubica en la región central del país, abarcando desde el denominado Piedemonte llanero hasta Los



Llanos Orientales. Su capital es Villavicencio, a 89,9 kilómetros al sur de la capital del país. El departamento del Meta es uno de los más extensos de Colombia, con un área de 85.770 km² (7,5% del territorio nacional), en donde se concentra una gran riqueza hídrica que proporcionan los numerosos afluentes del río Orinoco que nacen en la Cordillera Oriental y cruzan el departamento. Si bien forma parte de las llanuras orientales de Colombia, el departamento cuenta con áreas montañosas andinas como el Parque Natural de la Serranía de la Macarena.

El clima que predomina en Meta es el **Am** o *tropical monzónico*, en el que las temperaturas medias exceden los 18°C todos los meses y la oscilación térmica es leve (5-7°C). Las precipitaciones son muy abundantes (2500 mm) y superan las pérdidas por evaporación. Se describe en el oeste de África y en el sudeste asiático.

Los pilares de la economía son la agricultura, ganadería y minería, y en los últimos años destaca la extracción de petróleo crudo y gas. La población bovina representa el 7,38% del total del país. La piscicultura es otro factor económico importante, y en ríos y estanques artificiales se pesca bagre, mojarra, bocachico y cachama. La industria se ocupa principalmente en la elaboración de bebidas, extracción y refinado de aceite de palma, trilla de arroz, así como en la actividad metalúrgica y de materiales para la construcción.

a) Muestra



Entre los meses de julio y noviembre de 2014 se visitaron 14 explotaciones de ganado vacuno en 10 municipios del departamento de Meta, obteniéndose un total de 311 de muestras de sangre de bovinos Cebú, Brahman, Siementhal, Jersey, Girolando (cruce de cebú Gir con Holstein) y Brangus, alimentados en praderas de *Brachiaria* spp. cuya superficie oscila entre 51 y 6000 Ha ($\bar{x} = 831 \pm 1675$). Los pozos constituyen la principal fuente de agua de bebida de los rumiantes (50%). En el 71% de los predios las heces se almacenan en estercoleros, y sólo en un 14% se destina el estiércol al abonado de otras fincas.

Ninguna de las explotaciones se asentaban en terrenos inundables, y todas tenían caños permanentes. En el 29% se instalaron sistemas de drenaje, y el 50% de los ganaderos señalaron la presencia de caracoles acuáticos en sus terrenos.

El conocimiento de la fasciolosis se confirmó en el 64% de los encuestados, quienes calificaron de medio-grave el nivel de importancia de esta parasitosis. La observación de control parasitario siguiendo las indicaciones de un profesional veterinario constituyó la opción más extendida (50%), aunque la realización de exámenes coprológicos previos al tratamiento de las reses sólo supuso el 14%.

En el 57% de las explotaciones se desparasita cada 6 meses con ivermectina + fenbendazol, dosificándose los productos según el peso de los rumiantes. La rotación del principio activo se situó alrededor del 64%, y el porcentaje de respuestas afirmativas a la valoración de la eficacia del tratamiento parasitario fue del 36%.



3.2.- Determinación de la seroprevalencia de trematodosis bovina

3.2.1. ELISA (*enzyme linked-immunosorbent assay*)

Se emplearon placas de microtitulación para la determinación de anticuerpos IgG específicos frente a la proteína recombinante FhrAPS (*F. hepatica*) y a la fracción antigénica CdP1 (*C. daubneyi*).

a) Obtención de la proteína recombinante FhrAPS

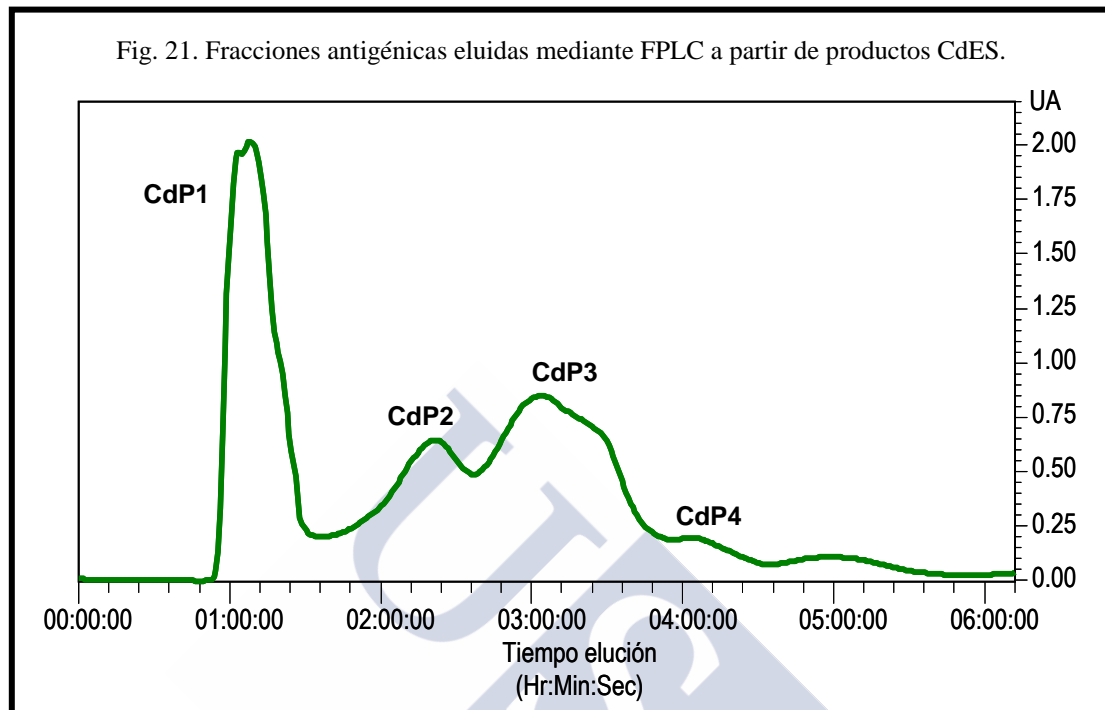
La proteína recombinante del tegumento de *F. hepatica* FhrAPS se obtuvo tras la expresión de un gen del trematodo hepático de aproximadamente 180 pares de bases, que se introdujo a tal efecto en el vector pGEX-2T (Pharmacia®) (Paz-Silva y cols., 2005). Debido a que el resultado final es una proteína de fusión (GST-proteína), se utilizó una columna de afinidad GST (glutathione S-transferase, Pharmacia®) para su purificación. La proteína resultante se sometió a la acción de la trombina para finalmente obtener un péptido de 2,9 kDa (Arias, 2007; Piñeiro, 2013; Oliver, 2014).

b) Purificación de la fracción CdP1

En un matadero de Lugo se examinaron el rumen y abomaso de vacas sacrificadas y se procedió a recoger los trematodos adultos *C. daubneyi* vivos, que después de varios lavados en tampón fosfato salino (PBS; *phosphate buffered saline*, pH 7,4), se cultivaron en medio líquido RPMI (Sanchís y cols., 2012). Por cada trematodo se añadieron 4 mL de este medio de cultivo y se mantuvieron en un incubador Incu-Safe® durante aproximadamente 9 horas a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%, renovando el medio cada 3 horas. Posteriormente, el líquido se mantuvo en una ultracentrífuga refrigerada a 12.000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se dializó de forma extensiva frente a agua y se denominó CdES (productos de excreción/secreción de *C. daubneyi*).

A continuación, los productos CdES se inyectaron en un sistema Duo-Flow (Bio-Rad®, Madrid, España) de comatografía líquida FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) con una columna Sepharosa S-200 HR que permite la separación de proteínas de peso molecular entre 1000 y 5 kDa (Francisco, 2007). Para el fraccionamiento de los antígenos de excreción/secreción se empleó un tampón salino compuesto por fosfato bisódico, fosfato monosódico y cloruro sódico. Todas las soluciones y los antígenos se hicieron pasar por un filtro de 0,22 µm antes de su inyección, para preservar la integridad de las bombas del sistema y de la columna (Paz-Silva y cols., 2010).

La purificación de los productos de excreción/secreción de *C. daubneyi* proporcionó proteínas de 57 (CdP1) (Fig. 21), 43-30 (CdP2), 25 (CdP3) y <13 kDa (CdP4), en coincidencia con Francisco (2007) y Paz-Silva y cols. (2010).



Protocolo de los inmunoensayos

Se siguieron los protocolos descrito por Arias (2007), Francisco (2007) y Bonilla (2013), que se resumen en la Tabla 4. Antes de procesar las muestras séricas, y con objeto de determinar en qué condiciones se obtenían diferencias óptimas entre los sueros de los animales infectados (positivos) y de los testigos (negativos), se hicieron las pruebas correspondientes con diferentes diluciones de antígeno, sueros e inmunoconjugados. Como testigos positivos se emplearon sueros de animales con infecciones activas demostradas en el matadero, y como testigos negativos los sueros de terneros de 2 meses de edad.

Para calcular el punto de corte, se utilizaron sueros de 12 terneros de 4 meses que no habían salido nunca al pasto, y que no eliminaban huevos de trematodos como se demostró mediante la técnica de sedimentación (Sanchís y cols., 2013). Los análisis coprológicos de estos animales testigos negativos se repitieron a los 2 meses para asegurarnos de que no estaban infectados.

El valor del punto de corte se determinó estimando la media de las densidades ópticas de cada uno de los terneros más tres veces la desviación estándar. De este modo, se consideraron animales positivos con FhrAPS cuando las absorbancias eran mayores de 0,398, y con CdP1 si superaban el valor de 0,543.

Tabla 4.- Protocolo de la técnica ELISA con los antígenos FhrAPS y CdP1.

Fase	Reactivos	Tiempo
1.Sensibilización placas	FhrAPS: 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CdP1: 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	10-12 horas / 4°C
2. Bloqueo puntos unión inespecífica.	PBS + Tween + leche desnatada	1/2 hora / 37°C
3. Muestras problema	Sueros 1/50	1/2 hora / 37°C
4. Segundo anticuerpo	Rabbit anti-bovine IgG 1/1000 (FhrAPS) Rabbit anti-bovine IgG 1/2000 (CdP1)	1/2 hora / 37°C
5. Substrato	OPD + citrato + H ₂ O ₂	10 min (oscuridad)

Los sueros de los bovinos de Cundinamarca y Meta se analizaron en el Laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo (USC), y los de Antioquia en el Laboratorio de Parasitología e Doenças parasitarias de la Faculdade de Medicina Veterinaria de Lisboa (UL) (Portugal).

3.2.2. Procesamiento de datos

Todos los datos recogidos en las distintas fases de este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010, y su análisis se llevó a cabo mediante el paquete estadístico IBM SPSS para Windows, versión 20.0.

En el apartado de estadística descriptiva, se determinó la prevalencia de animales infectados, que se expresó como el porcentaje de animales positivos a las técnicas de sedimentación y ELISA, y el intervalo de confianza al 95% (95% IC). La comparación de todos los datos se realizó mediante el test de Chi cuadrado, considerándose que existían diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

La validación de las técnicas inmunoenzimáticas se llevó a cabo en relación con la técnica de sedimentación como prueba de referencia o *gold standard*, en trabajos previos (Arias y cols., 2010; Bonilla, 2013), en los que se establecieron unos valores de sensibilidad y especificidad del 86% y 88% para el FhrAPS-ELISA, y del 83% y 87% para el CdP1-ELISA.

3.3.- Seroprevalencia de trematodosis en Cundinamarca

En el 93% (84, 100) de las explotaciones se diagnosticaron rumiantes positivos al FhrAPS-ELISA, resultando negativas sólo Cortés y Villa Loyola ($\chi^2= 73,006$, $P= 0,001$) (Tabla 5).

Tabla 5.- Seroprevalencia individual de anticuerpos IgG frente a *F. hepatica* en granjas de Cundinamarca.

Finca	N	FhrAPS-ELISA			Finca	N	FhrAPS-ELISA		
		n	P (%)	IC 95%			n	P (%)	IC 95%
Cuatro vientos	12	4	33	7-60	Los Nogales	8	4	50	15-85
Albania	21	4	19	2-36	Los Sauces	12	3	25	1-50
Auca	16	6	38	14-61	Los Tonitos	1	1	100	100
Balsora	24	6	25	8-42	Lusitania	10	6	60	30-90
Coclí	27	4	15	1-28	Magara	15	3	20	0-40
Cortés	1	0	0	0	Marengo	5	1	20	0-55
El Adán	9	5	56	23-88	Olimpo	3	3	100	100
El Llano	2	1	50	0-100	Pampa	19	11	58	36-80
Guazucá	29	4	14	1-26	Pomar	7	6	86	60-100
Hato de Susa	40	25	63	47-78	Portezuela	8	4	50	15-85
La María	9	5	56	23-88	Salitre	19	5	26	7-46
La Ventana	1	1	100	100	San Pablo	20	13	65	44-86
Las Marías	10	3	30	2-58	San Pedro	16	7	44	19-68
Las Mercedes	17	8	47	23-71	Villa Alsacia	5	4	80	45-100
Los Gaques	1	1	100	100	Villa Loyola	7	0	0	0

El 40% (35, 45) del total de los bovinos muestreados presentaron valores considerados positivos de IgG ($\chi^2= 63,604$, $P= 0,001$), valores que coinciden con los señalados por Sanchís y cols. (2011) en una encuesta desarrollada en ganado vacuno de leche del Uruguay.

En el 97% (90-100) de las fincas se identificaron vacas positivas al CdP1-ELISA, y el 58% (53, 63) alcanzaron valores de IgG considerados positivos (Tabla 6). Estas diferencias resultaron significativas ($\chi^2 = 96,448$, $P = 0,001$).

Tabla 6.- Seroprevalencia individual de anticuerpos IgG frente a paramphistómidos en granjas de Cundinamarca.

Finca	N	CdP1-ELISA			Finca	CdP1-ELISA			
		n	P (%)	IC 95%		N	n	P (%)	IC 95%
Cuatro vientos	12	3	25	1-50	Los Nogales	8	3	38	4-71
Albania	21	8	38	17-59	Los Sauces	12	2	17	0-38
Auca	16	13	81	62-100	Los Tonitos	1	1	100	100
Balsora	24	12	50	30-70	Lusitania	10	3	30	2-58
Coclí	27	23	85	72-99	Magara	15	12	80	60-100
Cortés	1	0	0	0	Marengo	5	1	20	0-55
El Adán	9	6	67	36-97	Olimpo	3	2	67	13-100
El Llano	2	2	100	100	Pampa	19	5	26	7-46
Guazucá	29	13	45	27-63	Pomar	7	7	100	100
Hato de Susa	40	34	85	74-96	Portezuela	8	4	50	15-85
La María	9	1	11	0-32	Salitre	19	9	47	25-70
La Ventana	1	1	100	100	San Pablo	20	16	80	62-98
Las Marías	10	10	100	100	San Pedro	16	7	44	19-68
Las Mercedes	17	12	71	49-92	Villa Alsacia	5	2	40	0-83
Los Gaques	1	1	100	100	Villa Loyola	7	3	43	6-80

Teniendo en cuenta la localización de las explotaciones (Tabla 7), se determinó que en todas las áreas estudiadas existía un elevado riesgo de exposición a los trematodos mencionados, y la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Fasciola* y paramphistómidos osciló entre el 83 y el 100%.

Área	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		n	P (%)	IC 95%	n	P (%)	IC 95%
Albán	2	2	100		2	100	
Cajicá	1	1	100		1	100	
Chía	1	1	100		1	100	
Simijaca	1	1	100		1	100	
Facatativá	1	1	100		1	100	
Funza	1	1	100		1	100	
Guatavita	6	5	83	54-100	5	83	
Suesca	2	2	100		2	100	
Mosquera	1	1	100		1	100	
Soacha	2	2	100		2	100	
Sopó	3	3	100		3	100	
Tabio	1	1	100		1	100	
Tenjo	1	0	0		1	100	
Tocancipá	1	1	100		1	100	
Ubaté	3	3	100		3	100	
Sibaté	1	1	100		1	100	
Zipaquirá	2	2	100		2	100	
Estadísticos	$\chi^2= 16,607$ $P= 0,411$			$\chi^2= 4,138$ $P= 0,999$			

El análisis individual de los valores de seroprevalencia según la zona de origen mostró las cifras más elevadas de positividad a *Fasciola hepatica* en bovinos de Cajicá, y frente a paramphistómidos en Cajicá y Sibaté (Tabla 8). Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas.

No se analizaron los resultados en función de la raza, porque todas las reses eran Holstein. Una vez establecidas las prevalencias de fasciolosis y de paramphistomidosis, el siguiente paso consistió en el análisis de la infección simultánea por ambos trematodos (Tabla 8). La sensibilización frente a *F. hepatica* y paramphistómidos resultó del 29%, mientras que el 32% nunca estuvieron en contacto con alguno de los dos trematodos.

Tabla 8.- Seroprevalencias individuales de anticuerpos IgG en Cundinamarca en función de su localización.

Área	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		n	P (%)	IC 95%	n	P (%)	IC 95%
Albán	13	8	62	35-88	5	38	12-65
Cajicá	7	6	86	60-100	7	100	
Chía	36	20	56	39-72	23	64	48-80
Simijaca	40	25	63	47-78	34	85	74-86
Facatativá	16	6	38	14-61	13	81	62-100
Funza	9	5	56	23-88	1	11	0-32
Guatavita	9	7	78	51-100	7	78	51-100
Suesca	41	8	20	7-32	16	39	24-54
Mosquera	5	1	20	0-55	1	20	0-55
Soacha	39	7	18	6-30	25	64	49-79
Sopó	55	12	22	11-33	29	53	40-66
Tabio	19	11	58	36-80	5	26	7-46
Tenjo	7	0	0		3	43	6-80
Tocancipá	17	8	47	23-71	12	71	49-92
Ubaté	27	15	56	37-74	13	48	29-67
Sibaté	10	3	30	2-58	10	100	
Zipaquirá	24	6	25	8-42	12	50	30-70
Estadísticos		$\chi^2= 16,607$ $P= 0,411$			$\chi^2= 4,138$ $P= 0,999$		

Tabla 9.- Análisis combinado de las seroprevalencias en Cundinamarca.

FhrAPS-ELISA	CdP1-ELISA	N	%	IC 95%
+	+	108	29	24-33
+	-	40	11	8-14
-	+	108	29	24-33
-	-	118	32	27-36
Total		374		

De los resultados recogidos en la Tabla 9 se puede concluir que el 68% de los rumiantes analizados ha estado en contacto con alguno de los trematodos (ELISA positivo), de forma mayoritaria con metacercarias de paramphistómidos. En un estudio desarrollado en el noroeste de la Península

Ibérica y norte de Portugal, Arias y cols. (2011) comprobaron que el 14% de las reses sacrificadas en un matadero tenían adultos de *F. hepatica* y del paramphistómido *Calicophoron daubneyi*.

Algunos estudios han evidenciado la infección por *F. hepatica* en ganado vacuno de Cundinamarca

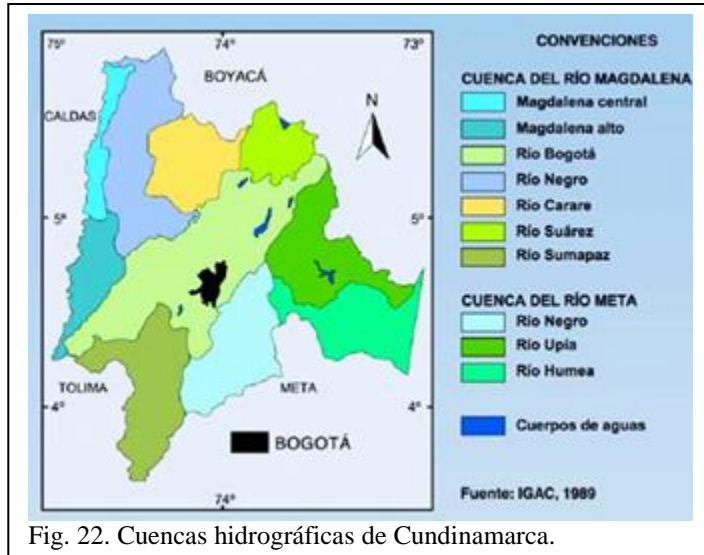


Fig. 22. Cuencas hidrográficas de Cundinamarca.

(Pulido y cols., 2011), pero no existen datos sobre la paramphistomidosis. A pesar de su denominación, la Sabana de Bogotá no es en realidad una sabana, puesto que no se caracteriza precisamente por precipitaciones escasas y temperaturas muy elevadas (Bonilla y cols., 2013). Al contrario, se describen frecuentes lluvias y las temperaturas generalmente son inferiores de 20° C. Además, hay que

tener en cuenta que existe un sistema de lagunas naturales y ciénagas que funcionan como reguladores de la humedad, porque actúan como *esponjas* del río Bogotá y afluentes, sirviendo como depósitos y reservorios naturales para la recolección de aguas pluviales (Fig. 22).

La ausencia de diferencias en función de la localización de las explotaciones indica que el riesgo de exposición a los trematodos es similar en todas las áreas del departamento estudiadas. Es importante destacar que la fase externa del ciclo de ambos trematodos, *Fasciola* y paramphistómidos, transcurre de forma idéntica: se requiere de localizaciones con abundante humedad, que favorezcan la presencia de caracoles limneidos que actúan como hospedadores intermediarios. Investigaciones previas señalaron la posibilidad de infección mixta en un mismo ejemplar de caracol, que podría emitir cercarias de ambas especies de trematodos parásitos (Abrous y cols., 2000).

3.4.- Seroprevalencia de trematodosis en Antioquia

En el 83% (66, 100) de las explotaciones se diagnosticaron rumiantes positivos al FhrAPS-ELISA (Tabla 10), pero no se demostraron diferencias significativas ($\chi^2= 18,000$, $P= 0,389$). El 65% (62, 72) del total de los bovinos muestreados presentaban valores de IgG considerados positivos ($\chi^2= 206,724$, $P= 0,001$).

En el 67% (45, 88) de las fincas se identificaron vacas positivas al CdP1-ELISA ($\chi^2= 18,000$, $P= 0,389$), con una seroprevalencia individual del 28% (23, 33) ($\chi^2= 143,371$, $P= 0,001$).

Tabla 10.- Seroprevalencia individual de anticuerpos IgG frente a trematodos en granjas de Antioquia.

Finca	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		n	P (%)	IC 95%	n	P (%)	IC 95%
Andorra							
Libanito							
El Filo	24	23	96	88-100	2	8	0-19
El Porvenir	5	5	100		0	0	
El Remolino	21	20	95	86-100	2	10	0-22
El Roblal	38	37	97	92-100	3	8	0-16
Encierro	20	18	90	77-100	0	0	
La Cristalina	9	9	100		0	0	
La Hermosa	3	0	0		2	67	13-100
La Isabela	4	4	100		1	25	0-67
La Linda	7	3	43	6-80	0	0	
La María	49	38	78	66-89	10	20	9-32
La Marianita	6	0	0		3	50	10-90
La Rinconada	15	14	93	81-100	2	13	0-31
La Suiza	5	5	100		0	0	
Las Aguas	26	1	4	0-11	19	73	56-90
Los Guadales	10	1	10	0-29	5	50	19-81
Los Laureles	9	1	11	0-32	9	100	
Los Llanos	30	0	0		25	83	70-97
Valle Urbano	15	13	87	69-100	0	0	

Teniendo en cuenta la **localización** de las granjas, en Angostura no se detectaron explotaciones positivas a *Fasciola*, y en San Pedro a paramphistómidos (Tabla 11). Mediante Kruskal-Wallis se comprobó que no existían diferencias significativas ($P > 0,05$).

Tabla 11.- Seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos en áreas de Antioquia.

Área	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		<i>n</i>	P (%)	IC 95%	<i>n</i>	P (%)	IC 95%
Angostura	1	0	0		1	100	
Don Matías	2	2	100		1	50	0-100
Entrerríos	11	9	82	59-100	8	73	46-99
San José	1	1	100		1	100	
San Pedro	2	2	100		0	0	
Santa Rosa	1	1	100		1	100	

La seroprevalencia individual de anticuerpos frente a trematodos en ganado vacuno de Antioquia, según la **ubicación** de los predios, se resume en la Tabla 12. Los valores máximos frente a FhrAPS-ELISA se encontraron en Entrerríos, y con CdP1-ELISA en Angostura, diferencias que resultaron estadísticamente significativas.

Tabla 12.- Seroprevalencia individual de anticuerpos IgG frente a trematodos en áreas de Antioquia.

Área	N	<i>n</i>	P (%)	IC 95%	<i>n</i>	P (%)	IC 95%	
Angostura	30	0	0		25	83	70-97	
Don Matías	18	10	56	33-79	9	50	27-73	
Entrerríos	161	135	84	78-90	20	12	7-18	
San José	49	38	78	66-89	10	20	9-32	
San Pedro	12	8	67	40-93	0	0		
Santa Rosa	26	1	4	0-11	19	73	56-90	
Estadísticos				$\chi^2 = 127,488$ $P = 0,001$				$\chi^2 = 101,446$ $P = 0,001$

En relación con la **raza**, la única explotación que contenía mayoritariamente **Holstein x Jersey** alcanzó los porcentajes más altos de prevalencia de fasciolosis y de paramphistomidosis (Tabla 13), pero no se demostraron diferencias significativas ($P > 0,05$).

		Holstein	Holstein x Jersey	<i>Bos taurus</i>
	N	15	1	2
FhrAPS-ELISA	<i>n</i>	13	1	1
	P (%)	87	100	50
	IC (95%)	69-100		0-100
CdP1-ELISA	<i>n</i>	10	1	
	P (%)	67	100	50
	IC (95%)	43-91		0-100

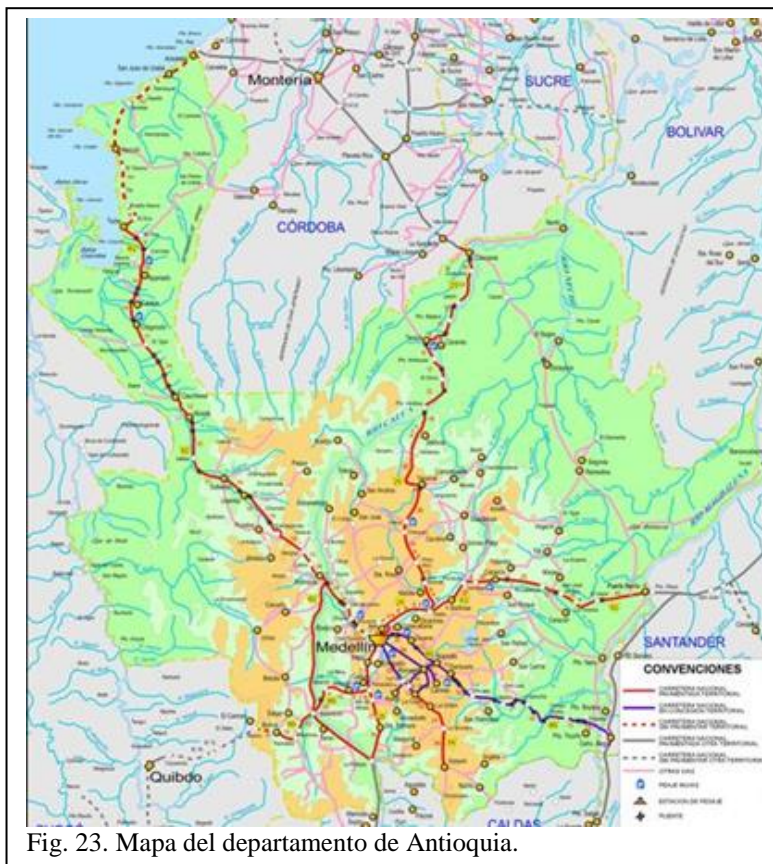
El análisis individual de los resultados mostró los valores más elevados de seroprevalencia frente a *Fasciola hepatica* en los vacunos **Holstein** (66%), y frente a paramphistómidos en los **cruces de Holstein y Jersey**, pero sólo se demostró significación estadística en este último (Tabla 14). En una encuesta desarrollada entre ganado vacuno del Uruguay, Sanchís y cols. (2011) afirmaron que la seroprevalencia de fasciolosis era del 67%, oscilando entre el 43,5% en los bóvidos de leche y el 73,5% en los de carne + leche/carne.

		Holstein	Jersey	Holstein x Jersey	
	N	289	2	5	Kruskal-Wallis
FhrAPS-ELISA	<i>n</i>	190	0	2	$\chi^2= 5,147$ $P= 0,076$
	P (%)	66	0	40	
	IC (95%)	60-71		0-83	
CdP1-ELISA	<i>n</i>	77	2	4	$\chi^2= 12,102$ $P= 0,002$
	P (%)	27	100	80	
	IC (95%)	22-32		45-100	

Finalmente, el análisis conjunto de seroprevalencia de fasciolosis y paramphistomidosis señaló la presencia de exposición a alguno de los trematodos en el 86% de los rumiantes (Tabla 15). El 15% de las reses exhibieron anticuerpos que reaccionaron con los antígenos de ambos parásitos.

Tabla 15.- Análisis conjunto de las seroprevalencias frente a trematodos en Antioquia.

FhrAPS	CdP1	N	%	IC 95%
+	+	50	15	11-18
+	-	63	19	14-23
-	+	179	52	47-58
-	-	49	14	11-18
Total		341		



La ausencia de diferencias entre las explotaciones según su origen, parece indicar que las trematodosis estudiadas se encuentran ampliamente distribuidas en el departamento de Antioquia. Como se refleja en la Figura 23, este departamento se encuentra profusamente irrigado por numerosos ríos y riachuelos que van a integrar los cursos del río Magdalena y del río Cauca, proporcionando un entramado complejo que surte de agua a la mayor parte de la superficie de Antioquia.

En una investigación previa se reportó la presencia de paramphistomidosis bovina en una finca de Antioquia, en la que se puso de manifiesto la participación de dos moluscos hospedadores en simpatria, *Limnaea columella* y *Galba truncatula* (López y cols., 2008). En opinión de algunos investigadores, *G. truncatula* es el hospedador intermediario principal, y *L. columella* el hospedador intermediario alternativo (Longo y cols., 2005). También resulta sorprendente que Rodríguez y cols. (2012) detectasen ácidos nucleicos (ADN) de *F. hepatica* en el agua de bebida del 53,7% de explotaciones de ganado bovino de Antioquia.

3.5.- Seroprevalencia de trematodosis en el Meta

Se detectaron bovinos con valores positivos de anticuerpos frente a *F. hepatica* en el 93% (79, 100) de las explotaciones ($\chi^2= 43,920$, $P= 0,001$) (Tabla 16), mientras que la seroprevalencia individual resultó del 31% (26, 36) ($\chi^2= 43,920$, $P= 0,001$).

En el 64% (39, 89) de las ganaderías se identificaron rumiantes positivos al CdP1-ELISA ($\chi^2= 96,915$, $P= 0,001$, y la seroprevalencia individual de paramphistomidosis resultó en torno al 27% (22, 32) ($\chi^2= 96,915$, $P= 0,001$).

Finca	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		n	P (%)	IC 95%	n	P (%)	IC 95%
Adisonia	26	4	15	2-29	13	50	31-69
Barcelona	36	6	17	4-29	6	17	4-29
Bramadora	30	2	7	0-16	0	0	
Cencerro	5	0	0		0	0	
Corpoica	14	4	29	5-52	11	79	57-100
El Palmar	61	19	31	20-43	7	11	3-19
Las Margaritas	9	3	33	3-64	4	44	12-77
La Esperanza	6	1	17	0-46	4	67	29-100
La Manuelita	8	3	38	4-71	0	0	
Las Brisas	20	11	55	33-77	9	45	23-67
El Mirador	26	6	23	7-39	15	58	39-77
Potreritos	30	21	70	54-86	15	50	32-68
Quinterlandia	31	11	35	19-52	0	0	
Rincón del Tigre	15	5	33	9-57	0	0	

Teniendo en cuenta su **localización**, no se detectaron explotaciones positivas a *Fasciola* en Puerto Rico ni en Vistahermosa. Todas las granjas contaban con rumiantes positivos al CdP1-ELISA (Tabla 17). Mediante Kruskal-Wallis se comprobó que no existían diferencias significativas ($P > 0,05$).

Tabla 17.- Seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos en granjas del Meta.

Área	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		<i>n</i>	P (%)	IC 95%	<i>n</i>	P (%)	IC 95%
Acacias	2	1	50	0-100	2	100	
Cumaral	2	1	50	0-100	1	50	0-100
Mesetas	1	1	100		1	100	
Puerto López	1	1	100		1	100	
Puerto Rico	1	0	0		1	100	
Primavera	1	1	100		1	100	
Villavicencio	2	2	100		2	100	
Vistahermosa	1	0	0		1	100	

En la Tabla 18 se presentan los valores de seroprevalencia individual de anticuerpos frente a trematodos en ganado vacuno del Meta. Los títulos más elevados de fasciolosis se obtuvieron en Mesetas, y los de paramphistomidosis en Primavera, demostrándose además que estas diferencias eran estadísticamente significativas ($\chi^2 = 43,920$, $P = 0,001$).

Tabla 18.- Seroprevalencia individual de anticuerpos IgG frente a trematodos según la localización de las granjas del Meta.

Área	N	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
		<i>n</i>	P (%)	IC 95%	<i>n</i>	P (%)	IC 95%
Acacias	39	5	13	2-23	4	10	1-20
Cumaral	35	6	17	5-30	6	17	5-30
Mesetas	26	12	46	32-60	13	50	32-68
Puerto López	26	4	15	2-29	13	50	31-69
Puerto Rico	31	11	35	19-52	0	0	
Primavera	26	6	23	7-39	15	58	39-77
Villavicencio	44	25	57	42-71	26	59	45-74
Vistahermosa	15	5	33	9-57	0	0	

En relación con la **raza**, a excepción de los bovinos **Jersey**, se encontraron individuos positivos pertenecientes a todas las razas, con los valores más elevados en los Brangus (Tabla 19). No se observaron rumiantes positivos al CdP1-ELISA en ejemplares Angus ni Jersey.

Tabla 19.- Seroprevalencia individual de anticuerpos IgG frente a trematodos según la raza de los bovinos.							
	N	n	FhrAPS-ELISA		n	CdP1-ELISA P	
			P (%)	IC 95%		P (%)	IC 95%
Angus	15	5	33	9-57	0	0	
Brahman	87	23	26	17-36	21	24	15-33
Brangus	30	21	70	54-86	15	50	32-68
Girolando	47	8	17	6-28	4	9	1-16
Holstein	20	11	55	33-77	9	45	23-67
Jersey	5	0	0		0	0	
Estadísticos	$\chi^2 = 35,392$ $P = 0,001$				$\chi^2 = 29,014$ $P = 0,001$		

Se detectaron bovinos seropositivos a los dos trematodos en el 14% de las muestras analizadas, en tanto que el 55% resultaron negativos a las pruebas inmunoenzimáticas (Tabla 20).

Tabla 20.- Análisis conjunto de seroprevalencias de anticuerpos IgG frente a trematodos en el Meta.				
FhrAPS	CdP1	N	%	IC 95%
+	+	42	14	10-17
+	-	54	17	13-22
-	+	42	14	10-17
-	-	173	55	50-61
Total		311		

En una encuesta desarrollada entre ganado vacuno del Uruguay, Sanchís y cols. (2011) afirmaron que la seroprevalencia de fasciolosis era del 67%, oscilando entre el 43,5% en los bóvidos de leche y el 73,5% en los de carne + leche/carne.

Como se mencionó en el análisis de los datos obtenidos en bovinos del departamento de Antioquia, no se observaron diferencias significativas entre las explotaciones en función de su ubicación, de lo que se concluye que en todas las áreas estudiadas se dan las condiciones edafoclimáticas adecuadas para el desarrollo de la fase externa del ciclo biológico de los trematodos *Fasciola hepatica* y paramphistómidos. En el mapa que se muestra a continuación (Fig. 24) se puede observar que el departamento del Meta se encuentra ampliamente irrigado por numerosos riachuelos y cursos de

agua, que finalmente van a desembocar al río Orinoco (a excepción del río Macaya, que lo hace en la cuenca del Amazonas). Se debe hacer constancia además que las temperaturas en el Meta oscilan alrededor del 6°C en el páramo, entre 18 y 24°C en el Piedemonte, y más de 24°C en la llanura.

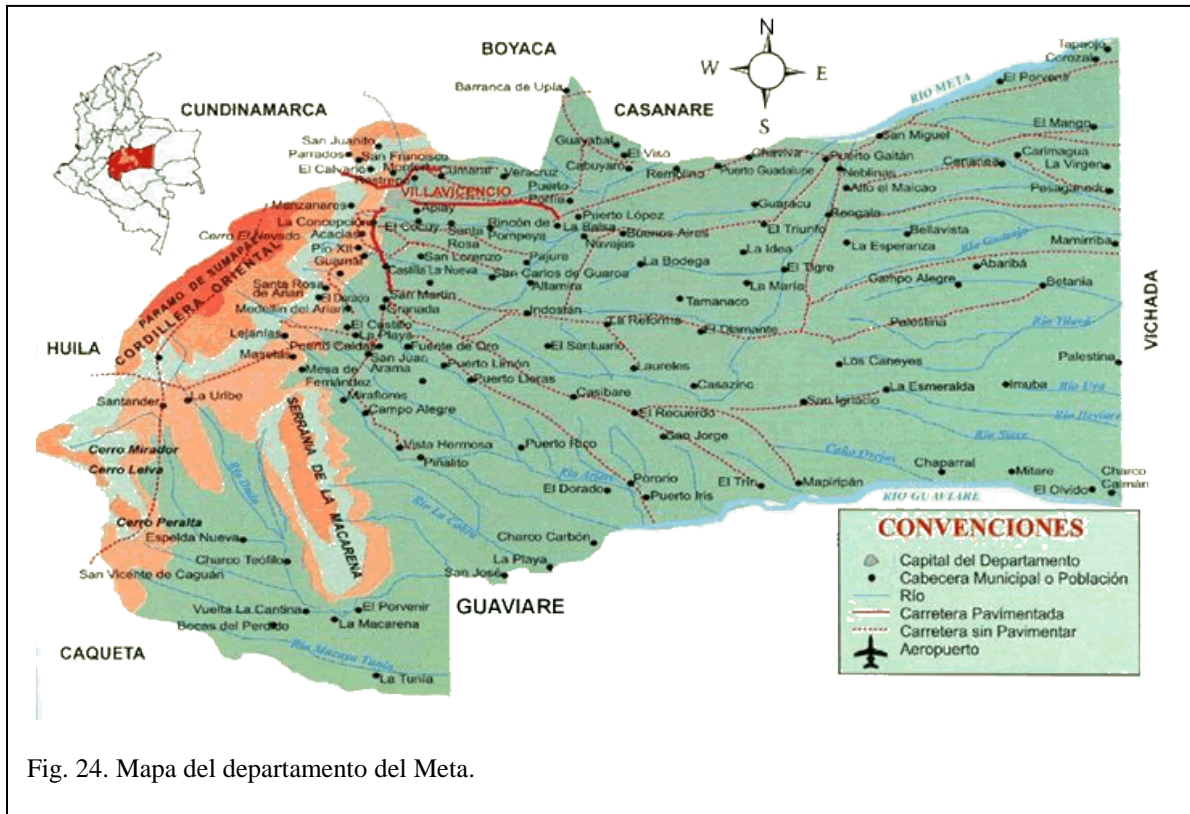
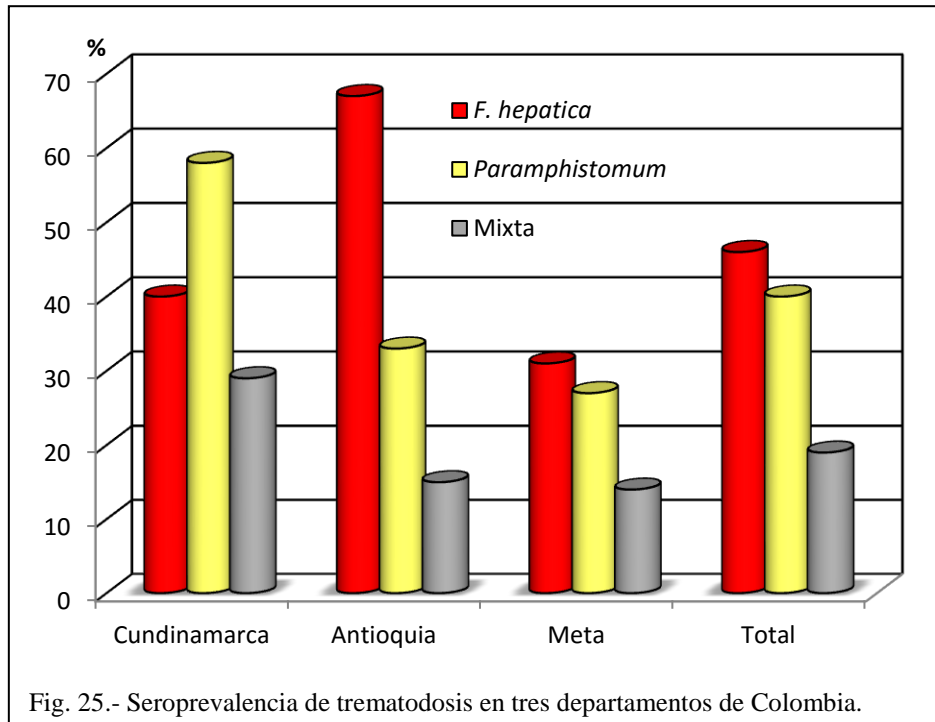


Fig. 24. Mapa del departamento del Meta.

Existen algunas referencias a la observación de diferentes géneros de amphistómidos en el Meta, como *Cotylophoron* y *Paramphistomum* (Griffiths y cols., 1986; Benavides y Romero, 2001), pero no se dispone de información acerca de su importancia ni distribución.

3.6.- Análisis global de la seroprevalencia de trematodosis en Colombia

En la Figura 25 se resumen los resultados de la aplicación del FhrAPS-ELISA y del CdP1-ELISA para la estimación de las seroprevalencias de anticuerpos IgG frente a *Fasciola hepatica* y a paramphistómidos, respectivamente, en los tres departamentos de Colombia analizados.



Los porcentajes más elevados frente a la proteína recombinante de *F. hepatica* (FhrAPS) se obtuvieron en Antioquia, y los más bajos en el Meta ($\chi^2 = 96,292$, $P = 0,001$). En Cundinamarca se detectaron las mayores seroprevalencias de paramphistomidosis y de nuevo en el Meta las más bajas ($\chi^2 = 77,488$, $P = 0,001$). Finalmente, la seropositividad simultánea a ambos trematodos fue superior en Cundinamarca e inferior en el Meta ($\chi^2 = 33,162$, $P = 0,001$). El análisis global de los resultados mostró unos valores similares de exposición a trematodos hepáticos (46%; 43-49) y ruminales (40%; 37-43), con un porcentaje de infección mixta del 19% (17-22). No se debe olvidar que la fase externa del ciclo de ambos transcurre de forma idéntica, en hábitats caracterizados por humedad abundante y temperaturas superiores a los 10°C, porque estas condiciones aseguran la supervivencia de caracoles anfibios limneidos, que actúan como hospedadores intermediarios.

Es interesante destacar también el desconocimiento que existe en Colombia de la paramphistomidosis.

4.- RELACIÓN ENTRE EL MANEJO DEL GANADO VACUNO EN COLOMBIA Y LA SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A TREMATODOS

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



Las notables cifras de seroprevalencia de las trematodosis en el ganado bovino de las tres regiones en estudio indican un riesgo importante de exposición a metacercarias de *Fasciola* y de paramphistómidos. Por este motivo, se llevó a cabo un análisis con objeto de establecer la posible influencia del manejo de los rumiantes y su exposición a estos trematodos. En concreto, se profundizó en las características de los predios, el nivel de conocimiento de los cuidadores y en los mecanismos de control parasitario. Finalmente, sólo se muestran los resultados que reportaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Es importante resaltar que algunos aspectos de la encuesta sólo se orientaron a la infección por *F. hepatica*, puesto que ninguno de los encuestados tenían conocimiento de los paramphistómidos.

4.1.- Encuesta para conocer las características de manejo del ganado bovino en Cundinamarca, Antioquia y Meta

<u>A. Datos finca</u>						
Nombre	Fecha visita	Municipio	Vereda			
*Extensión (Ha)						
<50	51-100	101-150	151-200	> 200		
*Composición pastos						
Kikuyo	Kikuyo + rye-grass		<i>Brachiaria</i>			
*Nº vacas en ordeño						
50	51-100	101-150	151-200	>200		
*Otras especies animales						
No	Ovinos	Caprinos	Equinos	Chigüiros		
<u>B. Manejo animales</u>						
*Manipulación pastos (recolección, corte, almacenamiento)						
Sí	No					
*Origen del agua bebida						
Pozo	Nacedero	Quebradas	Aljibe	Acueducto	Vallado	Río
*Manipulación excrementos del ganado						
Estercolero	Nada	Abono cultivos agrícolas				

<u>C. Factores de riesgo</u>			
*Zona Inundable			
Sí	No		
*Presencia permanente de caños			
Sí	No		
*Existencia de sistemas de drenaje			
Sí	No		
*Presencia de caracoles			
Sí	No	Desconocido	
<u>D. Nivel de conocimiento propietarios</u>			
*Conoce la enfermedad o parásito			
Sí	No		
*Importancia			
Ninguna	Leve	Moderada	Grave
*Antecedentes de parasitosis			
Sí	No		
<u>E. Actuación propietarios</u>			
*Recibe asistencia técnica			
Sí	No		
*Tipo de asistencia técnica			
Veterinario	Otras		
*Realiza control parasitario			
Sí	No		
*Considera análisis coprológicos para el control parasitario			
Sí	No		
*Criterio seguido en la desparasitación			
Veterinario	Experiencia propia	Otros	

*Producto							
Abamectina + Triclabendazol	Fenbendazol + Rafoxanide	Fenbendazol	Triclabendazol	Albendazol			
IVM + clorsulon	Levamisol	Ivermectina	Eprinomectina	Clorsulon			
IVM + Fenbendazol	IVM + Albendazol						
*Frecuencia:							
Secado	Parto	Lactación	Mensual	Bimensual	Trimestral	Semestral	Anual
*Estimación de la dosis de producto							
Peso	Visual	Otros					
*Rotación principio activo							
Sí	No						
*Desparasita todo el ganado							
Sí	No						
*Valora eficacia tratamiento antiparasitario							
Sí	No						

Los datos obtenidos se analizaron con χ^2 , y la relación entre las variables estimadas y los resultados mediante la estimación de los valores de **odds ratio** (OR) (Thrusfield, 2005).

		Enfermedad		
		Sí	No	
Exposición	Sí	a	b	a + b
	No	c	d	c + d
		a + c	b + d	

$$OR = \frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}}$$

El criterio seguido para establecer si existía relación entre los factores analizados y la aparición de las enfermedades fue el siguiente:

OR= 1 No existe relación

OR> 1 Factor de riesgo

OR< 1 Factor de protección

Si el valor de OR es superior a 1, se establece que la exposición a un factor entraña un *riesgo* para el desarrollo de enfermedad en la población, y si es inferior a 1, que *protege* o *reduce* la probabilidad de enfermar.

4.2.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de trematodosis en Cundinamarca

Todas las muestras recogidas en la Sabana de Bogotá pertenecían a vacunos Holstein de aptitud lechera. El mayor riesgo de exposición a *Fasciola* se estableció en explotaciones en las que los bovinos se alimentaban en pastos de menos de 50 Ha de **superficie**, en las que se encontraban de 51 a 150 vacas en ordeño (Tabla 21). No se observó influencia sobre la seroprevalencia de paramphistomidosis.

Tabla 21.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el manejo de los bovinos en Cundinamarca.							
FhrAPS-ELISA				CdP1-ELISA			
Superficie pasto	P (%)	IC	OR		P (%)	IC	OR
<50	54	43-65	2,1		57		
51-100	34	27-42	0,7		60		
101-150	38	30-45	0,9		56		
$\chi^2 = 8,594, P = 0,014$					$\chi^2 = 0,728, P = 0,695$		
Nº vacas/ordeño							
<50	43	26-61	1,2		57		
51-100	44	34-54	1,3		57		
101-150	45	35-54	1,3		49		
151-200	21	12-31	0,4		63		
>200	42	30-54	1,1		68		
$\chi^2 = 11,991, P = 0,017$					$\chi^2 = 7,450, P = 0,114$		

No se demostró relación entre la manipulación de los pastos o la eliminación de excretas, y la seroprevalencia de trematodosis. En relación con el **agua de bebida**, el mayor riesgo de exposición al trematodo hepático se demostró en los rumiantes que ingieren agua procedente de quebradas, en tanto que para aquellos animales que beben agua de acueductos se encontró el mayor riesgo de infección por paramphistómidos (Tabla 22). Cabra y Herrera (2007) señalaron que en el 46% de las explotaciones de Cundinamarca, los animales bebían de acueductos, por un 7,3% que lo hacía de quebradas. Sanchís y cols. (2011) destacaron que en Uruguay las vacas de aptitud lechera alcanzaban las seroprevalencias más elevadas de paramphistomidosis, atribuyéndolo a que, a diferencia del resto de razas de vacuno, bebían de abrevaderos situados en las inmediaciones de las salas de ordeño, provistos de agua potable.

Tabla 22.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el agua de bebida en Cundinamarca.							
Agua bebida	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA			
	P (%)	IC	OR	P (%)	IC	OR	
Pozo	50	41-58	1,8	56	47-65	0,9	
Nacedero	17	7-28	0,3	42	29-56	0,5	
Aljibe	25	8-42	0,5	50	30-70	0,7	
Río	37	19-54	0,9	57	39-74	1	
Acueducto	38	27-49	0,9	76	67-86	2,9	
Vallado	43	30-56	1,2	59	46-71	1	
Quebradas	62	35-88	2,5	38	12-65	0,4	
			$\chi^2 = 21,081, P = 0,002$				$\chi^2 = 18,544, P = 0,005$

En las fincas que no contaban con **asistencia técnica** veterinaria se comprobó un mayor riesgo de exposición a *Fasciola* (OR= 2,4) (Tabla 23); aunque se estableció relación entre la seropositividad a paramphistómidos y el asesoramiento veterinario, ninguno de los ganaderos entrevistados conocían la paramphistomidosis, de modo que tampoco solicitaron asesoramiento en este sentido. Es interesante tener en cuenta que en este departamento, los ganaderos reciben asistencia técnica a través de veterinarios (19%) o de unas Unidades Municipales de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA) (49%). El porcentaje de predios sin asistencia es del 32% (Cabra y Herrera, 2007).

Se estableció relación entre la ausencia de realización de análisis rutinarios antes de la desparasitación de los animales y la presencia de anticuerpos frente a *Fasciola* y paramphistómidos. También se comprobó riesgo de exposición al trematodo gástrico en los animales de fincas en las que se tenía en cuenta el criterio de los veterinarios para elegir el fármaco a emplear. Este resultado ha de interpretarse con cautela, dado que la posibilidad de trematodosis gástrica raramente había sido considerada entre los veterinarios clínicos en esta región. No se demostró influencia del criterio seguido en el tratamiento de los animales y la presencia de anticuerpos frente a los trematodos.

Se demostró mayor riesgo de seroprevalencia de paramphistomidosis en los rumiantes tratados con una mezcla de Avermectina + Salicilanilida + Bencimidazol y en los desparasitados con bencimidazoles, principalmente en la fase de secado (Tabla 24). Resulta un poco llamativa la observación de seroprevalencia de paramphistomidosis en bovinos tratados con salicilianilidas, lo que induce a considerar que se trata de compuestos sin actividad frente al trematodo gástrico

(Clorsulon, Rafoxanida) (Sanchís y cols., 2013), o que un único tratamiento a lo largo del año no resulta suficiente para el control de esta trematodosis.

En cuanto a la fasciolosis, se relacionó la administración de antiparasitarios durante el secado y el parto, y la seroprevalencia de anticuerpos. En un estudio previo se observó que el 48,7% de los ganaderos de este departamento desparasitaban cada 6 meses, en el postparto el 26%, y cada 3 meses el 15,3% (Cabra y Herrera, 2007).

Tabla 23.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y las medidas de control parasitario.							
Asistencia técnica	P (%)	IC	OR		P (%)	IC	OR
Otras	60	41-79	2,4		36	17-55	0,4
Veterinario	38	33-43	0,4		59	54-64	2,6
$\chi^2 = 4,675, P = 0,031$					$\chi^2 = 5,196, P = 0,023$		
Análisis copromicroscópicos rutinarios							
No	44	38-49	2		63	57-68	2,2
Sí	28	19-37	0,5		44	34-54	0,5
$\chi^2 = 7,077, P = 0,008$					$\chi^2 = 10,381, P = 0,001$		

Tabla 24.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el tratamiento antiparasitario.							
	FhrAPS-ELISA				CdP1-ELISA		
Antiparasitario	P (%)	IC	OR		P (%)	IC	OR
Avermectina+Salicilanilida	44				44	19-68	0,6
Averm+Bencimidazol	34				56	47-65	0,9
Averm+Salicil+Benc	40				64	54-73	1,4
Bencimidazol	48				67	58-76	1,7
Benc+Salicil	25				39	23-55	0,4
$\chi^2 = 8,793, P = 0,118$					$\chi^2 = 19,517, P = 0,002$		
Frecuencia de desparasitación							
Secado	29	18-40	0,6		77	67-87	2,9
Secado+Parto	49	42-57	2,3		59	51-66	1,1
Sec+Parto+Lactancia	30	21-39	0,6		49	39-58	0,6
Parto+Lactancia	0				43	6-80	0,5
$\chi^2 = 20,593, P = 0,001$					$\chi^2 = 22,511, P = 0,001$		

Cuando la estimación de la dosis de fármaco a aplicar sobre los animales no se realiza en función de su peso, existe un elevado riesgo de presencia de anticuerpos frente a *Fasciola*, y el fenómeno contrario es observado para paramphistómidos, aunque es necesario recordar que en ningún momento se orientó la terapia antiparasitaria al control de trematodos ruminales (Tabla 25).

La demostración de mayor riesgo de exposición a *Fasciola hepatica* cuando no se tiene en cuenta la rotación de los fármacos administrados, y no se valora la eficacia del tratamiento aplicado, sirve de resumen de la relación entre el manejo de los animales y las posibilidades de infección en el ganado bovino de la región de Sabana de Bogotá.

Tabla 25.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y la administración de antiparasitarios.						
Estimación dosis a administrar						
Peso	38	33-43	0,3	59	54-64	2,4
Visual	56	23-88	1,9	11	0-32	0,1
Otros	86	60-100	9,5	71	38-100	1,8
$\chi^2 = 7,449, P = 0,024$			$\chi^2 = 8,682, P = 0,013$			
Rotación antiparasitarios						
No	48	41-54	2,4	59		
Sí	27	20-34	0,4	55		
$\chi^2 = 15,688, P = 0,001$			$\chi^2 = 0,601, P = 0,438$			
Valoración eficacia tratamiento						
No	42	36-47	2,3	57		
Sí	24	11-37	0,4	64		
$\chi^2 = 4,916, P = 0,027$			$\chi^2 = 0,827, P = 0,363$			

Las condiciones climáticas en la región de estudio favorecen el crecimiento de especies vegetales forrajeras prácticamente todo el año, que se aprovecha para la alimentación del ganado vacuno. Estas también son condiciones idóneas para el desarrollo de la fase exógena del ciclo biológico de los trematodos *Fasciola hepatica* y paramphistómidos. Parece irrefutable el hecho de que la administración de tratamientos antiparasitarios no resulta suficiente para reducir la exposición de las vacas de leche a las formas infectivas (metacercarias) de trematodos parásitos, y que habría que considerar la integración de diferentes medidas asociadas, entre las que cabría destacar asegurar la salubridad del agua de bebida de los animales, y evitar el acceso de los animales a zonas potencialmente peligrosas. Sería interesante un mayor asesoramiento de los cuidadores de animales en materia de actividad de antiparasitarios, ciclos de trematodos, y de la necesidad de realizar análisis para conocer frente a qué luchar o la eficacia de las medidas adoptadas.

4.3.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de trematodosis en Antioquia

En el ganado bovino de Antioquia se detectó un mayor riesgo de exposición a *Fasciola hepatica* en los rumiantes de raza *Bos Taurus*, mientras que la presencia de anticuerpos frente a paramphistómidos fue elevada en todas las razas a excepción de la Holstein (Tabla 26).

Los bovinos que se alimentaban en praderas de hasta 100 Ha alcanzaron el mayor riesgo de exposición a *F. hepatica*, en tanto que la seroprevalencia de paramphistomidosis fue superior en las extensiones más grandes (101-150 Ha).

La manipulación de las heces influyó de forma diferente en el riesgo de exposición a trematodos: en las granjas en las que no se recogen las deyecciones o se acumulan en una zona determinada (estercolero) se alcanzan las mayores seroprevalencias de anticuerpos frente a *F. hepatica*, al contrario de lo observado frente a paramphistómidos.

Tabla 26.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el manejo de los bovinos en Antioquia.							
FhrAPS-ELISA							
Raza	P (%)	IC	OR		P (%)	IC	OR
<i>Bos taurus</i>	89	77-100	4,3		59	41-78	3,3
Brangus	72	52-93	1,3		78	59-97	7,9
Hol x Jersey	40	0-83	0,3		80	45-100	8,3
Holstein	66	60-71	0,6		27	22-32	0,2
Jersey	0				100		
$\chi^2 = 12,013, P = 0,017$				$\chi^2 = 38,996, P = 0,001$			
Superficie pasto							
<50	80	74-86	4,4		18	12-24	0,3
51-100	81	68-95	2,6		0		
101-150	37	28-46	0,1		51	42-61	5,9
151-200							
>200							
$\chi^2 = 54,894, P = 0,001$				$\chi^2 = 48,504, P = 0,001$			
Manipula estiércol							
No	76	70-82	3,2		17	12-23	0,3
Estercolero	49	40-58	0,3		43	35-52	3,7
Abono	0				0		
$\chi^2 = 22,402, P = 0,001$				$\chi^2 = 24,400, P = 0,001$			
Caños permanentes							
No	86	79-92	5,2		14	8-21	0,3
Sí	53	46-60	0,2		36	29-42	3,3
$\chi^2 = 31,037, P = 0,001$				$\chi^2 = 15,258, P = 0,001$			

Drenaje							
No	85	79-90	9,0		12	7-17	0,1
Sí	38	30-47	0,1		50	41-59	7,5
	$\chi^2 = 68,984, P = 0,001$				$\chi^2 = 52,430, P = 0,001$		

En todas las explotaciones se administraba a los animales agua procedente de pozos. La ausencia de sistemas de drenaje incrementa las posibilidades de que los bovinos entren en contacto con metacercarias de los trematodos y desarrollen una respuesta inmunitaria humoral.

Tabla 27.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos en Cundinamarca.			
Importancia de la fasciolosis			
	FhrAPS-ELISA		
	P (%)	IC	OR
Ninguna	24	10-37	0,1
Leve	0		
Moderada	79	74-85	25,2
Grave	0		
	$\chi^2 = 100,114, P = 0,001$		
Análisis parasitario previo			
No	74	68-80	3,5
Sí	44	34-55	0,3
	$\chi^2 = 23,198, P = 0,001$		
Criterio elección antiparasitario			
Veterinario	42	34-50	0,1
Experiencia propia	88	81-94	6,6
Otros	92	84-100	7,8
	$\chi^2 = 72,703, P = 0,001$		

En ningún caso se consideró la fasciolosis como un problema grave, y el mayor riesgo de exposición se detectó en aquellas explotaciones cuyos administradores le atribuyen una importancia moderada. Por ello, resulta esperable que no se apliquen medidas adecuadas para su control. Un ejemplo que confirma esta hipótesis lo constituye el valor de OR= 3,5 que relaciona seropositividad de fasciolosis y ausencia de análisis parasitarios previos a la administración de tratamiento (Tabla 27). Otro se encuentra en que la respuesta mayoritaria cuando se planteó el criterio seguido para elección del antiparasitario, destacó que se basaba en experiencias propias o en otros criterios.

El análisis de los resultados en función del antiparasitario empleado evidenció que la administración de Abamectina + Triclabendazol en la fase de secado entraña un riesgo elevado de desarrollar anticuerpos frente al trematodo hepático (Tabla 28). En el caso de los paramphistómidos, se estableció relación con la aplicación de Fenbendazol y Triclabendazol en fechas próximas al parto.

Si se estima la dosis de antiparasitario de forma visual, existe un riesgo muy elevado de entrar en contacto con trematodos *F. hepatica*, al igual que sucede en aquellas explotaciones en las que no se analiza la eficacia del tratamiento aplicado.

Tabla 28.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el tratamiento antiparasitario.							
FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA				
Antiparasitario							
	P (%)	IC	OR		P (%)	IC	OR
Abamectina + Tcbz	89	83-94	11,0		9	5-14	0,1
Fbz + Rafoxanida	67	49-84	1,1		22	7-38	0,7
Fbz	12	2-22	0,0		67	52-81	7,2
Tcbz	48	37-59	0,4		44	33-55	2,8
$\chi^2= 97,786, P= 0,001$			$\chi^2= 19,517, P= 0,002$				
Frecuencia de desparasitación							
Secado	89	85-94	14,9		9	5-14	0,1
Parto	33	25-41	0,1		55	46-64	12,7
Mensual	67	40-93	1,1		0		
$\chi^2= 97,214, P= 0,001$			$\chi^2= 22,511, P= 0,001$				

Tabla 29.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y la administración de antiparasitarios.			
Estimación dosis a administrar			
	P (%)	IC	OR
Peso	0		
Visual	72	66-77	15,2
Otros	100		0,0
$\chi^2= 63,361, P= 0,001$			
Valoración eficacia tratamiento			
No	85	79-90	9,0
Sí	38	30-47	0,1
$\chi^2= 68,984, P= 0,001$			

Cuando la estimación de la dosis de fármaco a aplicar sobre los animales no se realiza en función de su peso, existe un elevado riesgo de presencia de anticuerpos frente a *Fasciola* (Tabla 29). Idéntico resultado se obtuvo al determinarse que existe relación entre la ausencia de valoración de la eficacia del tratamiento y la seroprevalencia de anticuerpos frente a *F. hepatica*.

4.4.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de trematodosis en Meta

En los animales de raza Brangus y Holstein se evidenció el mayor riesgo de exposición a ambos trematodos (Tabla 30), que aparecía principalmente en fincas de 151-200 Ha. La exposición a metacercarias de *F. hepatica* o paramphistómidos se incrementa si los animales beben de acueductos, pozos o quebradas. La presencia de caños permanentes favorece la exposición a paramphistómidos, en tanto que la ausencia de sistemas de drenaje lo hace a *F. hepatica*.

Tabla 30.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el manejo de los bovinos en el Meta.							
FhrAPS-ELISA				CdP1-ELISA			
	P (%)	IC	OR		P (%)	IC	OR
Raza							
Angus	33	9-57	1,0		0		
Brahman	26	17-36	0,6		24	15-33	1,0
Brangus	70	54-86	6,3		50	32-68	4,1
Girolando	17	6-28	0,3		9	1-16	0,2
Holstein	55	33-77	2,7		45	23-67	2,9
Jersey	0		0,0		0		
$\chi^2= 35,392, P= 0,001$				$\chi^2= 29,014, P= 0,001$			
Superficie pasto							
<50	35	13-58	1,2		24	3-44	0,8
51-100	25	18-33	0,6		28	21-36	1,1
101-150	7	0-15	0,2		10	1-19	0,3
151-200	44	35-53	2,8		32	24-40	1,5
>200							
$\chi^2= 23,048, P= 0,001$				$\chi^2= 7,918, P= 0,048$			
Agua de bebida							
Pozo	36	27-49	1,4				
Nacedero	19	8-29	0,5				
Quebradas	35	19-52	1,3				
Aljibe	21	3-39	0,6				
Acueducto	55	33-77	3,0				
Río	27	18-37	0,8				
$\chi^2= 12,382, P= 0,030$							
Caños permanentes							
No					0		
Sí					30	25-35	
				$\chi^2= 12,741, P= 0,001$			

Drenaje							
No	25	19-30	0,3				
Sí	51	40-63	3,2				
$\chi^2 = 17,894, P = 0,001$							
Conoce la fasciolosis							
No	23	15-31	0,6				
Sí	35	28-41	1,8				
$\chi^2 = 4,594, P = 0,032$							

El conocimiento de la fasciolosis no conlleva necesariamente buenos resultados en su control (Tabla 31). Por ejemplo, la seroprevalencia más elevada de anticuerpos frente a *F. hepatica* se observó en explotaciones en las que se atribuyó una importancia leve a la trematodosis hepática. También resulta interesante por sorprendente destacar que la presencia de anticuerpos se relacionó con aquellas explotaciones en las que afirmaban realizar análisis parasitológicos previos al tratamiento de los rumiantes.

Tabla 31.- Influencia del manejo en la seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos en el Meta.			
FhrAPS-ELISA			
Importancia del problema	P (%)	IC	OR
Ninguna	29	22-37	0,9
Leve	45	32-58	2,1
Moderada	27	18-37	0,8
Grave	9	0-26	0,2
$\chi^2 = 8,068, P = 0,045$			
Análisis parasitario previo			
No	23	17-28	0,3
Sí	51	41-61	3,6
$\chi^2 = 24,320, P = 0,001$			

El mayor riesgo de exposición al trematodo hepático se demostró en los rumiantes que recibían tratamiento a base de ivermectina +fenbendazol (Tabla 32); la sensibilización frente a paramphistómidos se relacionó con la administración de ivermectina, con periodicidad semestral.

No resulta sencillo explicar que las mayores posibilidades de entrar en contacto con metacercarias de *F. hepatica* se encuentren en los rumiantes de explotaciones que observan la rotación de principios activos como medida para el control de esta parasitosis en los bovinos.

Tabla 32.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y el tratamiento antiparasitario.						
Antiparasitario	FhrAPS-ELISA			CdP1-ELISA		
	P (%)	IC	OR	P (%)	IC	OR
lvm + Fbz	38	30-45	1,9	25	18-32	0,8
lvm + Abz	29	18-40	0,9	11	3-18	0,3
Fbz	23	10-36	0,6	26	12-39	0,9
lvm	19	9-30	0,5	54	40-67	4,2
$\chi^2 = 7,875, P = 0,049$			$\chi^2 = 28,263, P = 0,001$			
Frecuencia						
Mensual				20	6-34	0,7
Bimensual				0		
Trimestral				22	15-29	0,6
Semestral				35	27-43	2,0
				$\chi^2 = 20,593, P = 0,001$		
Rotación de antiparasitarios						
No	22	14-30	0,5			
Sí	35	29-42	2,0			
				$\chi^2 = 5,968, P = 0,015$		

Finalmente, los ganaderos que indican que en las ganaderías en las que se procede a pesar a los animales para estimar la dosis adecuada, presentan las tasas de seroprevalencia de fasciolosis más elevadas (Tabla 33). Se demostró una relación entre la no valoración del tratamiento asignado y la presencia de anticuerpos frente al trematodo hepático.

Tabla 33.- Relación entre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a trematodos y la administración de antiparasitarios.			
Estimación dosis a administrar			
Peso	35	28-41	1,7
Visual	24	16-32	0,6
Otros	0		
$\chi^2 = 4,175, P = 0,041$			
Valoración eficacia tratamiento			
No	37	29-45	1,7
Sí	26	19-32	0,6
$\chi^2 = 4,430, P = 0,035$			

4.5.- Seroprevalencia de trematodosis y manejo de bovinos en Colombia

Los tres departamentos analizados en el estudio actual representan casi 1/4 (23,4%) de la población ganadera bovina de Colombia. Las cifras de seroprevalencia de anticuerpos frente a trematodos hepáticos y ruminales, en especial estos últimos, hacen necesaria una reflexión para conocer las causas que pueden llevar a esta situación e intentar redireccionarla. Las encuestas epidemiológicas resultan muy útiles a tal fin, puesto que hacen posible identificar, con una base matemática, aquellos factores que puedan estar incluidos en la aparición de las enfermedades, o al menos en el riesgo de exposición a determinados agentes patógenos.

En la Tabla 34 se aporta un resumen del análisis de factores de riesgo asociados a la exposición al trematodo hepático en Colombia. Para facilitar su comprensión, la información se ha dividido en dos bloques, manejo de animales y acción sobre los hospedadores definitivos (tratamiento).

Tabla 34.- Resumen de los factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de fasciolosis en bovinos de Colombia.			
Manejo animales	Cundinamarca	Antioquia	Meta
Extensión pastos	<50 Ha	≤100 Ha	≤200 Ha
Caños permanentes	-	No	
Drenaje	-	No	Sí
Eliminación de estiércol	-	No	-
Análisis coprológicos rutinarios	No		Sí
Agua de bebida	Quebradas	-	Pozos/Acueductos
Desparasitación	-	Abam + TCBZ	IVM + FBZ
Rotaciones	No	-	Sí
Abam: abamectina; TCBZ: triclabendazol; IVM: ivermectina; FBZ: fenbendazol			

Como se puede observar, no resulta fácil determinar un patrón único en relación con el manejo de los animales, debido a que no hay unanimidad ni en la extensión de los pastos aprovechados por los rumiantes, la presencia permanente de caños, la existencia de sistemas de drenaje o la realización rutinaria de análisis coprológicos para determinar posible infección. Todo esto conduce a pensar que en realidad las condiciones climáticas de los tres departamentos no suponen obstáculo para el desarrollo del ciclo externo de *F. hepatica*, de ahí que un porcentaje notable de reses hayan tenido la

oportunidad de ingerir metacercarias y posteriormente desarrollar una respuesta inmunitaria humoral, con independencia de su lugar de origen.

Con respecto al análisis del tratamiento de los bovinos tampoco es posible llegar a una conclusión determinante, puesto que el empleo de bencimidazoles, entre los que se describe el Triclabendazol (fasciolicida más eficaz hasta la fecha) aparece como un factor ligado a la exposición a *F. hepatica*, tanto en rotaciones de producto como cuando no las hay.

La información recogida en la Tabla 35 tampoco permite progresar en el conocimiento de la exposición a paramphistómidos. Es necesario resaltar el nivel de conocimiento casi inexistente de esta trematodosis entre los encuestados, que dificulta en resumen la posibilidad de llegar a definir un patrón sobre el cual trabajar.

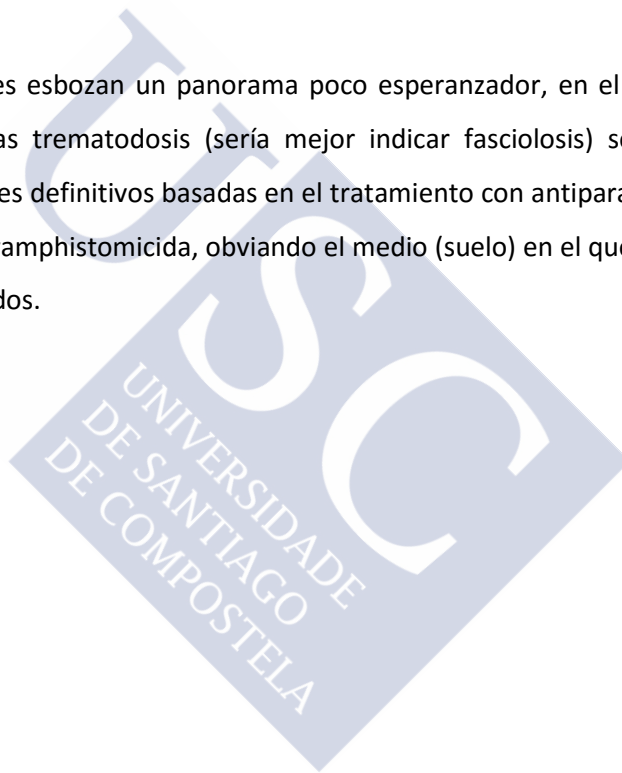
Tabla 35.- Resumen de los factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de paramphistomidosis en bovinos de Colombia.			
<u>Manejo animales</u>	Cundinamarca	Antioquia	Meta
Extensión pastos	-	101-150 Ha	≤200 Ha
Caños permanentes	-	Sí	-
Drenaje	-	Sí	-
Eliminación de estiércol	-	Sí	-
Análisis coprológicos rutinarios	No	-	Sí
Agua de bebida	Acueductos	-	Pozos/Acueductos
<u>Desparasitación</u>	Averm + Salicil + BZ	FBZ + TCBZ	IVM cada 6 meses
Rotaciones	No	-	-
Averm: avermectinas; Salicil: salicilanilidas; BZ: bencimidazoles; IVM: ivermectina FBZ: fenbendazol; TCBZ: triclabendazol			

De la combinación de las dos tablas anteriores, se puede inferir que con independencia de la presencia de caños permanentes o no, sistemas de drenaje o no, los limneidos hospedadores intermediarios gozan de condiciones adecuadas para sobrevivir bajo un amplio rango de temperaturas y pluviosidad. Es imprescindible una mención especial a la relación entre la bebida de agua procedente de acueductos (sistema público de conducción de agua potable) y el riesgo de exposición a *F. hepatica* y paramphistómidos. Una investigación previa demostró en Antioquia la presencia de ADN de *F. hepatica* en el agua que llegaba a predios de ganado bovino (Rodríguez y cols., 2012).

La evidencia de exposición a los trematodos con independencia de la extensión de los hatos, y de la eliminación del estiércol de las áreas de pastoreo de los bovinos, lleva a suponer que la infección de los caracoles anfibios por los *miracidios* tampoco entraña una gran complejidad; al contrario, la elevada humedad del suelo será favorecedora de su supervivencia hasta encontrar a los moluscos, que ha de transcurrir en un periodo no superior a 1 día (Dalton, 1999).

El análisis de la información relacionada con la administración de antiparasitarios revela notables contradicciones, si se tiene en cuenta que gran número de los encuestados afirmaron contar con asistencia técnica veterinaria, pero pocos solicitan análisis coprológicos para fundamentar el tratamiento ni para evaluar su efecto. También resulta cuestionable la aplicación de lactonas macrocíclicas sin establecer rotaciones con otros antiparasitarios.

Todos estos datos y reflexiones esbozan un panorama poco esperanzador, en el que se vislumbra poco éxito si el control de las trematodosis (sería mejor indicar fasciolosis) se fundamenta en acciones sobre los hospedadores definitivos basadas en el tratamiento con antiparasitarios de escasa actividad fasciolicida y nula paramphistomicida, obviando el medio (suelo) en el que se encuentran la fases infectivas de los trematodos.



5.- CONTROL INTEGRADO DE LA PARAMPHISTOMIDOSIS BOVINA



Como se ha indicado en el capítulo de **Antecedentes** (cfr. 24, 26), existe un importante nivel de información acerca del control de la fasciolosis, pero es escaso sobre la paramphistomidosis, haciéndose muy evidente en las posibilidades del tratamiento de los hospedadores definitivos.

En base a este argumento, y teniendo en cuenta que ambos trematodos desarrollan una fase externa del ciclo idéntica, se planteó un estudio para el control integrado de trematodosis en ganado vacuno. Teniendo en cuenta la escasa información de que se dispone en Colombia acerca de la paramphistomidosis, y conscientes de la posibilidad de coinfección en los rumiantes, se diseñó un procedimiento orientado al control de la infección por paramphistómidos basado I) en el tratamiento de los bovinos con un producto en fase de prueba fabricado por la compañía CARVAL (Colombia), compuesto por Oxiclozanida + Ivermectina, considerando la actividad de la salicilanilida frente a trematodos hepáticos (Mooney y cols., 2009; Athar y cols., 2011; Shokier y cols., 2013) y ruminales (Rolfe y Boray, 1987; Arias y cols., 2013b; Sanabria y cols., 2014), y II) en la reducción de la viabilidad de huevos de paramphistómidos en el medio, a través del empleo de esporas del hongo ovidica *Mucor circinelloides* (cepa CECT 20824), aislado en el laboratorio del Grupo de Investigación COPAR.

5.1.- Tratamiento de hospedadores definitivos en Colombia

Aunque no existe un procedimiento descrito específicamente para la evaluación de trematocidas (EMA, 2014), en general se recurre al criterio definido por la WAAVP (*World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*) para estimar la eficacia de antihelmínticos frente a nematodos gastrointestinales estrongílicos, que establece la toma de muestras en el momento del tratamiento de los animales, y a los 10-15 días post-tratamiento (Wood y cols., 1995).

Puesto que los bovinos empleados se encontraban en pastoreo, en riesgo de infección continuada, se consideró interesante desarrollar 2 tipos de ensayos, sobre animales positivos a la coprología, para conocer la eficacia de la Oxiclozanida sobre amphistomas adultos, y animales negativos, para determinar el posible efecto sobre trematodos inmaduros.

5.1.1. Diseño experimental

Se probó la eficacia de dos formulaciones a base de Oxiclozanida + Ivermectina y una tercera formulación de Oxiclozanida únicamente (Carval®, Colombia) sobre bovinos de 2 granjas ubicadas en el Departamento del Meta, El Rubí y Potreritos, que eliminaban huevos del trematodo gástrico en las heces:

A-Iny: 10 bovinos desparasitados mediante la administración inyectable del antihelmíntico (5 mg Oxiclozanida / Kg. p.v. + 200 µg Ivermectina / Kg.p.v.).

A-Or: 6 bovinos desparasitados mediante la aplicación oral del antihelmíntico (10 mg Oxiclozanida / Kg. p.v.).

A-PO: 11 bovinos desparasitados mediante la administración tópica del antihelmíntico (20 mg Oxiclozanida / Kg. p.v. + 500 µg Ivermectina / Kg.p.v.).

A-Testigo: 9 bovinos que se mantuvieron sin tratamiento como testigos.

Durante 5 semanas, se tomaron muestras fecales directamente del recto de los animales en una manga (Fig. 26), que se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis en el Laboratorio de Enfermedades parasitarias de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA; Bogotá, Colombia), mediante la técnica coprológica de sedimentación McMaster (Sanchís y cols., 2013).

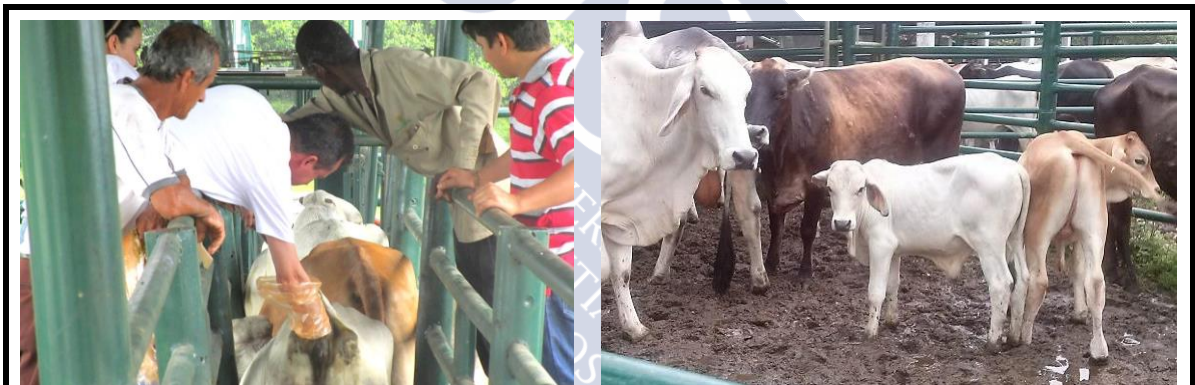


Fig. 26. Toma de muestras de heces de bovinos (Brahman x *Bos taurus*) en Acacías (Meta, Colombia).



Fig. 27. Aplicación tópica de antihelmíntico en bovinos.

Para establecer el efecto sobre las formas inmaduras de paramphistómidos, se emplearon otros 4 grupos de bovinos que inicialmente resultaron negativos a la coprología:

J-Iny: 12 bovinos desparasitados mediante la administración inyectable del antihelmíntico (5 mg Oxiclozanida / Kg. p.v. + 200 µg Ivermectina / Kg.p.v.).

J-Or: 8 bovinos desparasitados mediante la aplicación oral del antihelmíntico (10 mg Oxiclozanida / Kg. p.v.).

J-PO: 14 bovinos desparasitados mediante la administración tópica del antihelmíntico (20 mg Oxiclozanida / Kg. p.v. + 500 µg Ivermectina / Kg.p.v.).

J-Testigo: 12 bovinos que se mantuvieron sin tratamiento como testigos.

La eficacia del tratamiento antihelmíntico se estableció a los 15 días de la administración mediante los índices (Sanchís y cols., 2013):

$$\text{FEER (Faecal egg count reduction)} = [1 - (\text{FEC}_{15}/\text{FEC}_0)] \times 100 \text{ (FEC: faecal egg count)}$$

$$\text{RAP (Reducción de animales positivos)} = [1 - (\text{AP}_{15}/\text{AP}_0)] \times 100 \text{ (AP: animales positivos)}$$

Los resultados se analizaron mediante las pruebas no paramétricas de χ^2 y "U" de Mann-Whitney, con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión 20.0).

5.1.2. Resultados y Discusión

En la Tabla 36 se muestran los resultados de la actividad antihelmíntica sobre formas adultas de paramphistómidos. Los valores del FECR señalaron que con la administración oral se consiguió un efecto más precoz, y a los 15 días post-tratamiento la eficacia fue completa, un 17% por vía inyectable y 89% mediante aplicación tópica.

Tabla 36.- Eficacia de OXI + IVM sobre amphistómidos adultos.												
Día	Testigos (n= 12)			Inyectable (n= 12)			Oral (n= 8)			Pour on (n= 14)		
	HPG	FECR	RAP	HPG	FECR	RAP	HPG	FECR	RAP	HPG	FECR	RAP
0	77 ± 38			72 ± 31			80 ± 34			111 ± 24		
15	71 ± 26			60 ± 57	17	40	0	100	100	12 ± 57	89	82
30	71 ± 34			0	100	100	60 ± 90	25	50	0	100	100

Las diferencias en los valores de eliminación de huevos entre los diferentes grupos resultaron estadísticamente significativas ($\chi^2= 52,304$, $P= 0,007$). En estudios previos desarrollados en ganado vacuno se demostró que la administración vía oral de Oxiclozanida reportaba a los 15 días un porcentaje de FECR del 99%, y del 93% para el ARP en ganado vacuno de leche que eliminaba huevos de *C. daubneyi* (Arias y cols., 2013b). También se han desarrollado algunos estudios en pequeños rumiantes, como en cabras infectadas por *C. daubneyi*, en las que la Oxiclozanida presentó un efecto notable sobre los amphistómidos adultos (96%) (Paraud y cols., 2009). Con la administración de la salicilanilida a ovejas que eliminaban huevos de *Paramphistomum leydeni*, se consiguió una reducción del 99% de los trematodos adultos, y del 99,5% en la eliminación de huevos en heces (Sanabria y cols., 2014).

En el presente estudio, a los 30 días la eficacia resultó del 25-50% por vía oral (FECR, RAP), y 100% (FECR, RAP) para los grupos tratados por vía inyectable o tópica. Estos datos parecen indicar que la administración oral no eliminó las formas inmaduras del trematodo ruminal, que completaron su desarrollo hasta adultos.

En la Tabla 37 se resumen resultados obtenidos en los rumiantes negativos al inicio del estudio. En el grupo Testigo el 20% de los individuos eliminaron huevos de paramphistómidos a los 15 y 30 días,

mientras que ninguno de los que se desparasitaron por vía oral resultó positivo a la coprología. El porcentaje de individuos que eliminaban huevos después del tratamiento por vía inyectable fue de 9% (día 15) y 18% (día 30), mientras que la aplicación *pour on* se asoció con un 25% de positivos. Estas diferencias no fueron significativas ($\chi^2= 2,909$, $P= 0,406$). Prácticamente no existen investigaciones sobre este aspecto, pero se ha indicado la ausencia de diferencias entre cabras tratadas con Oxiclozanida frente a las formas inmaduras de *C. daubneyi* (82%), e individuos testigos (no tratados) (Paraud y cols., 2009).

Tabla 37.- Eficacia de OXI + IVM sobre amphistómidos inmaduros.									
Día	Testigos (n= 10)		Inyectable (n= 11)		Oral (n= 10)		Pour on (n= 16)		
	HPG	% Posit.	HPG	% Posit.	HPG	% Posit.	HPG	% Posit.	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	38 ± 19	20	90 ± 27	9	0	0	26 ± 30	25	
30	43 ± 13	20	60 ± 24	18	0	0	25 ± 31	25	

Los datos mostrados en este estudio muestran la dificultad de la evaluación de un tratamiento antiparasitario en animales en extensivo de acuerdo a las normas indicadas por la WAAVP (*World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology*) (Coles y cols., 1992), que establece un periodo de 10-15 días desde la administración del parasiticida hasta el momento de su valoración. Con la aplicación oral se consigue un 100% de eficacia, pero no se eliminan todas las fases inmaduras.

La administración inyectable o tópica de la salicilanilida tampoco resulta completamente eficaz frente a los paramphistómidos inmaduros. Si se extiende el periodo de evaluación a las 4 semanas, se obtienen mejores resultados frente a adultos, llegando a valores del FECR y del RAP del 100%. Esto podría significar que mediante estas vías de administración se retrase la actividad de la Oxiclozanida. Los datos recolectados se deben manejar con prudencia, ya que la eliminación de huevos de paramphistómidos fue moderada. La prueba de reducción del recuento de huevos en heces (*FECRT*) no se ha estandarizado para evaluar la eficacia de antihelmínticos frente a trematodos, y se ha indicado que podría resultar acertado hacerlo a los 14-21 días post-tratamiento (Wood y cols., 1995). De los resultados obtenidos se deduce que la administración oral de Oxiclozanida en una sola toma proporciona una eficacia muy elevada frente a los paramphistómidos adultos a los 15 días post-tratamiento, pero sería aconsejable aplicar otra a un intervalo de 15-21 días para eliminar aquellos trematodos juveniles que sobrevivieron al tratamiento y se convirtieron en adultos.

5.2.- Actividad de *Mucor circinelloides* sobre huevos de *C. daubneyi* en España

Se analizó la utilidad del empleo de esporas del hongo ovicida *M. circinelloides* (cepa CECT 20824), aislado en el laboratorio del Grupo de Investigación COPAR, para reducir la viabilidad de huevos de *Calicophoron daubneyi* presentes en las heces de vacas que se alimentaban en semi-extensivo en una explotación de Galegos (Riotorto, Lugo, España) (Longitud: 7° 14' 56.399" Oeste; Latitud: 43° 17' 6" Norte).

5.2.1. Propagación de esporas de *M. circinelloides*

La obtención de esporas de *M. circinelloides* se llevó a cabo en el medio de cultivo líquido COPFr (Arias y cols., 2013a). En un botellón de nalgeno de 10 L de capacidad, se añadieron 28,4 g de NaCl, 6,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, y 132,4 g de harina de trigo (*Triticum aestivum*) y 4 L de agua destilada. A continuación se esterilizó el medio a 121°C durante 20 minutos. Una vez que se alcanzó la temperatura ambiente, se añadieron 400 mL de una solución estándar que contenía 10^7 esporas de *Mucor* / mL (Fig. 28), y se cultivaron durante aproximadamente 1 mes, hasta que se alcanzó una concentración final próxima a 10^7 esporas / mL.

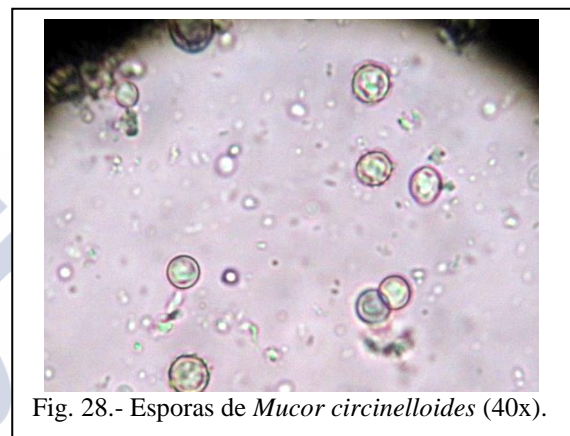


Fig. 28.- Esporas de *Mucor circinelloides* (40x).

5.2.2. Obtención de huevos de *Calicophoron daubneyi* (Riotorto, Lugo, España)



Fig. 29.- Toma de muestras de heces de vacuno en pastoreo infectado por *C. daubneyi*.

Se recogieron muestras de heces directamente del recto de vacas adultas con antecedentes de paramphistomidosis. Una vez en el Laboratorio del grupo COPAR (Facultad de Veterinaria, Lugo, España), se procesaron mediante la técnica coprológica de sedimentación, empleándose 5 g de heces de cada animal (Sanchís y cols., 2013). Después de comprobar la presencia de huevos del anfistómido (350 ± 125 huevos de *C. daubneyi* por gramo de

heces, HPG), se procedió a decantarlos de forma sucesiva, hasta conseguir una solución que contenía

500 huevos de *C. daubneyi* por mL. El paso siguiente consistió en dispensar 1 mL de la dilución en tubos eppendorf de 2 mL de volumen.

5.2.3. Ensayos para determinar la actividad ovicida de *Mucor circinelloides*

En el Laboratorio del grupo COPAR (Facultade de Veterinaria de Lugo) se dispusieron un total de 40 tubos eppendorf con huevos del trematodo, que se dividieron en los grupos siguientes:

G-Testigo: 30 tubos que se mantuvieron sin tratamiento, como testigos del ensayo.

G-*Mucor*: 30 tubos a los que se añadieron 200 μ L de una solución que contenía 10^7 esporas de *Mucor* / mL.

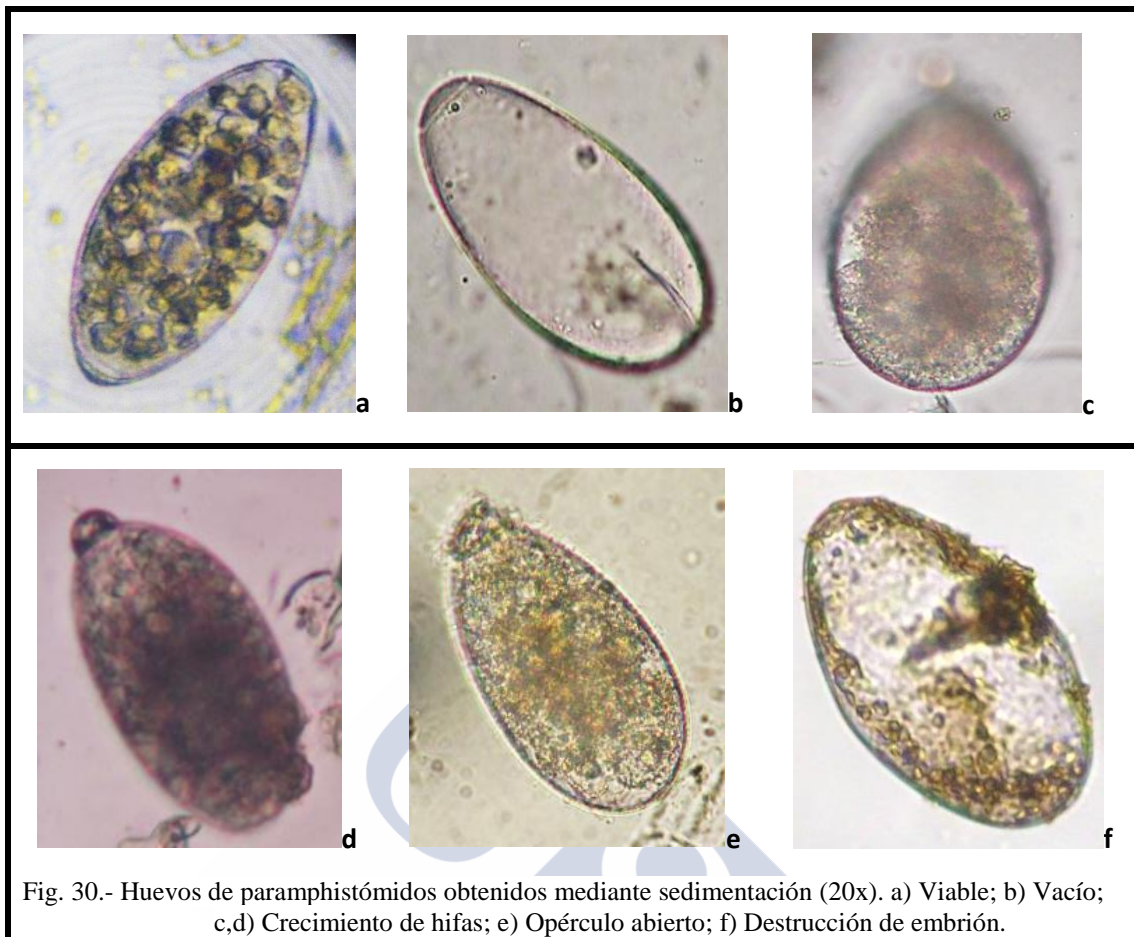
Durante 29 días, los tubos se mantuvieron a **temperatura ambiente** en el laboratorio (15-18°C) (10 tubos de cada grupo). Con este motivo, cada día de análisis se tomaba un tubo eppendorf de ambos grupos, que se descartaba al final del mismo.

En los días 0, 4, 7, 11, 14, 17, 21, 24 y 29 del estudio, se tomaron alícuotas de 50 μ L de 1 eppendorf por grupo, que se dispusieron en un portaobjetos de vidrio y después de colocar encima un cubreobjetos se observaron al microscopio óptico (40X). En cada caso, se visualizaron al menos 100 huevos por grupo, que se clasificaron de acuerdo a su integridad en huevos viables y no viables. En concreto, se consideraron no viables si cumplían alguno de estos criterios (Cazapal-Monteiro y cols., 2015):

- Estructuras poco marcadas, huevos vacíos
- Hifas adheridas
- Solución de continuidad en la cubierta
- Apertura del opérculo en huevo no desarrollado

El resto de los huevos se clasificaron como viables. También se procedió al recuento de los miracidios que aparecían.

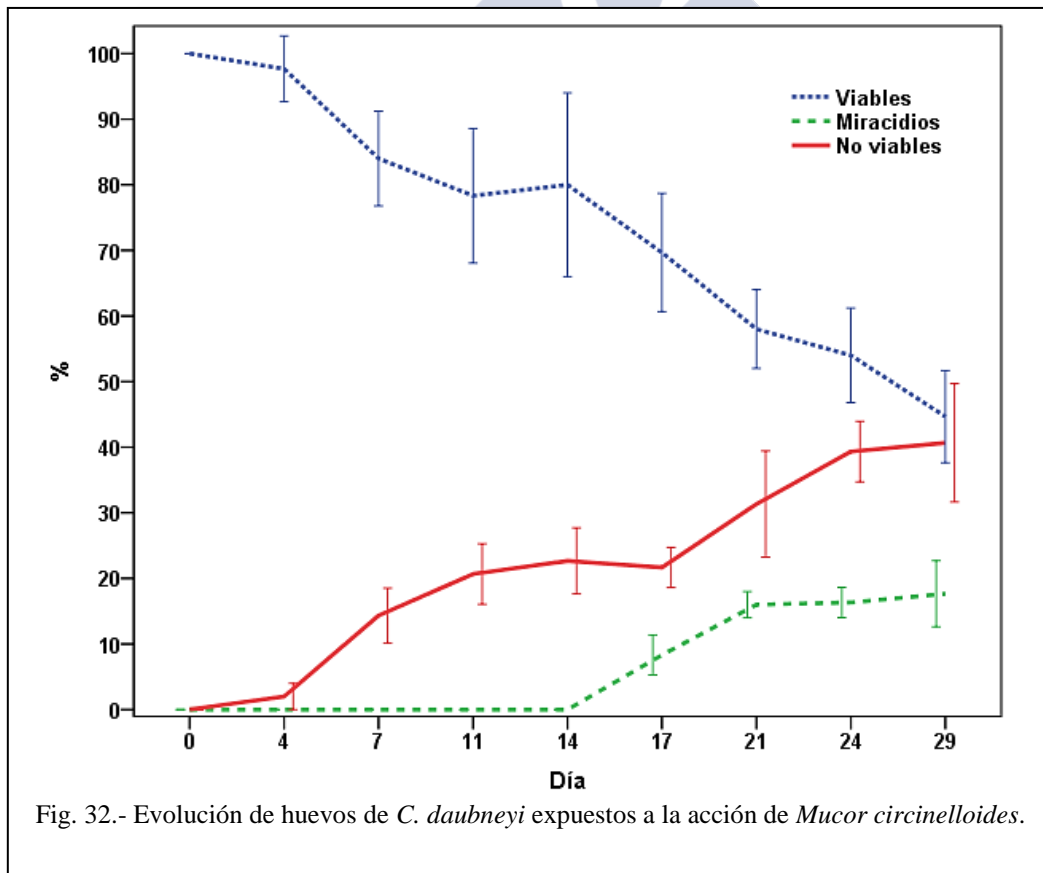
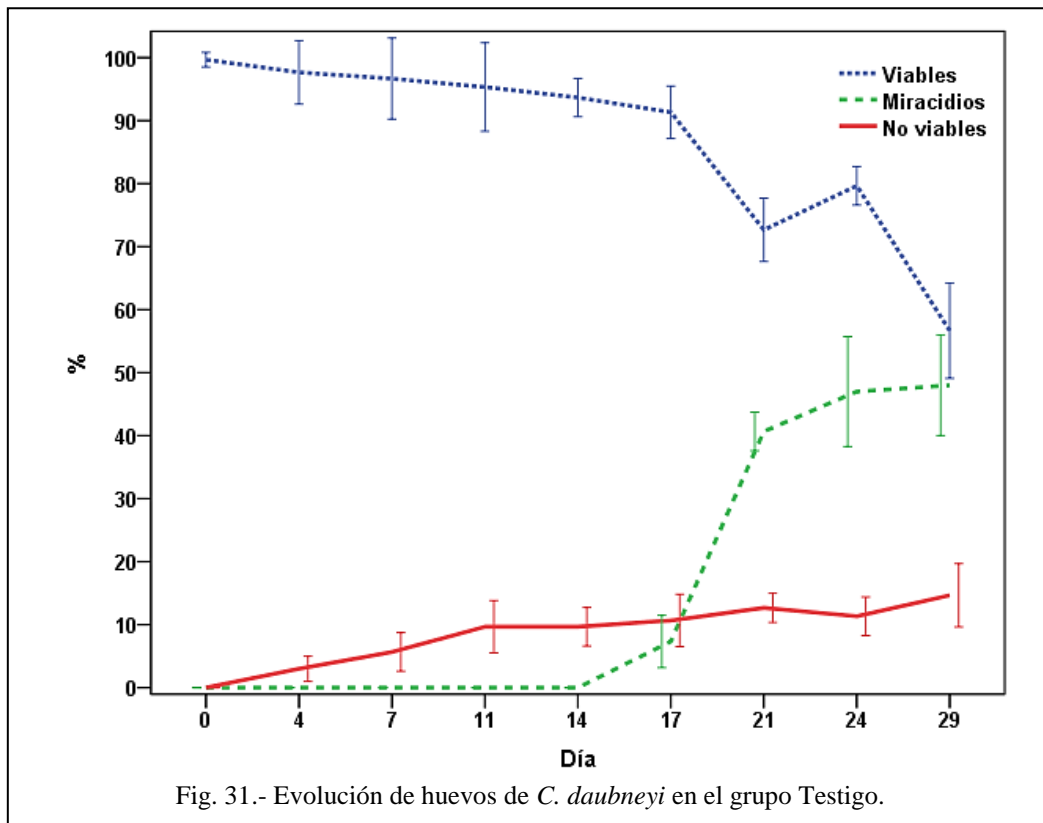
El análisis de los datos obtenidos se realizó con las pruebas no paramétricas de χ^2 y "U" de Mann-Whitney, utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión 20.0), estableciéndose que existía significación estadística si $P < 0,05$.



5.2.4. Resultados y Discusión

En la Figura 31 se representa la evolución de los huevos de *C. daubneyi* a temperatura ambiente (15-18°C). El número de huevos viables disminuyó a partir del día 17 de estudio, apareciendo los miracidios a los 21 días. Los recuentos de huevos no viables alcanzaron valores en torno a 10 desde el día 7.

Con la adición de esporas de *Mucor circinelloides* a los huevos de *C. daubneyi* mantenidos a temperatura ambiente (15-18°C), el porcentaje de viabilidad disminuyó desde el día 4 hasta el final del estudio, en que alrededor del 60% de los huevos del trematodo permanecían viables (Fig. 32).



A partir del día 17 se observaron miracidios en las preparaciones (Fig. 33), detectándose valores cercanos al 15% entre los días 21 y 29.



En la tabla 38 se resumen los resultados de la comparación de ambos grupos, tratado con *Mucor circinelloides* y Testigo, a la mitad y al final del ensayo. La adición de las esporas redujo el porcentaje de huevos viables en relación con el grupo Testigo, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Al final de la prueba, en el grupo expuesto al hongo ovicida el porcentaje de miracidios fue un 43% inferior ($P < 0,05$). En relación con los huevos no viables, aumentaron en un 59% a los 14 días de interacción con el hongo, y a los 29 días en un 69% ($P < 0,05$).

Tabla 38.- Efecto de la adición de esporas de <i>Mucor circinelloides</i> sobre la viabilidad de huevos de <i>Calicophoron daubneyi</i> en comparación con el grupo Testigo.						
Día	Viables		Miracidios		No viables	
	14	29	14	29	14	29
<i>M. circinelloides</i>	-14%	-10%		-43%	+59%	+69%
Estadísticos	U= -1,670 P= 0,095		U= -3,112 P= 0,002		U= -4,474 P= 0,001	

Estos datos señalan una actividad precoz de *Mucor circinelloides* sobre los huevos de *C. daubneyi*, de forma que a los 14 días ya se han alterado irreversiblemente más de la mitad. Asimismo, se confirma este efecto antagonista a los 29 días del estudio, puesto que el porcentaje de miracidios que se desarrollan se reduce de forma significativa en relación con el grupo Testigo.

5.3.- Actividad de *Mucor circinelloides* sobre huevos de paramphistómidos en Colombia

Se analizó el efecto de esporas del hongo ovidica *M. circinelloides* (cepa CECT 20824) sobre los huevos de paramphistómidos excretados por bovinos de la granja “Potreritos” (Villavicencio, Meta, Colombia).

5.3.1. Diseño experimental

Se tomaron muestras de heces de 10 bovinos raza Brangus (Brahman x Angus), que se analizaron mediante sedimentación (5 g; McMaster).

De las heces de cada animal se prepararon 4 cajas de plástico en las que se colocaron 5 g de heces. En dos de las cajas se añadieron 5 mL de una solución acuosa que contenía $1,4 \times 10^6$ esporas/mL, y en otras dos se añadieron 5 mL de agua destilada, como testigos.

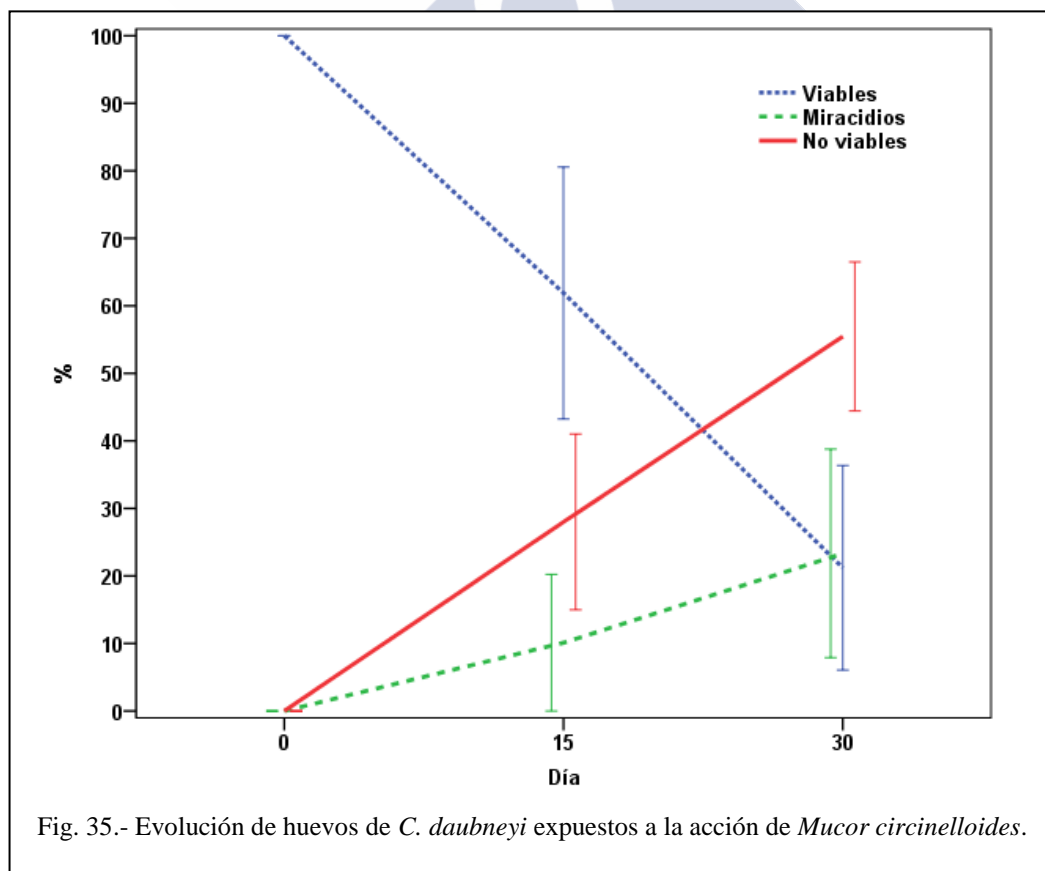
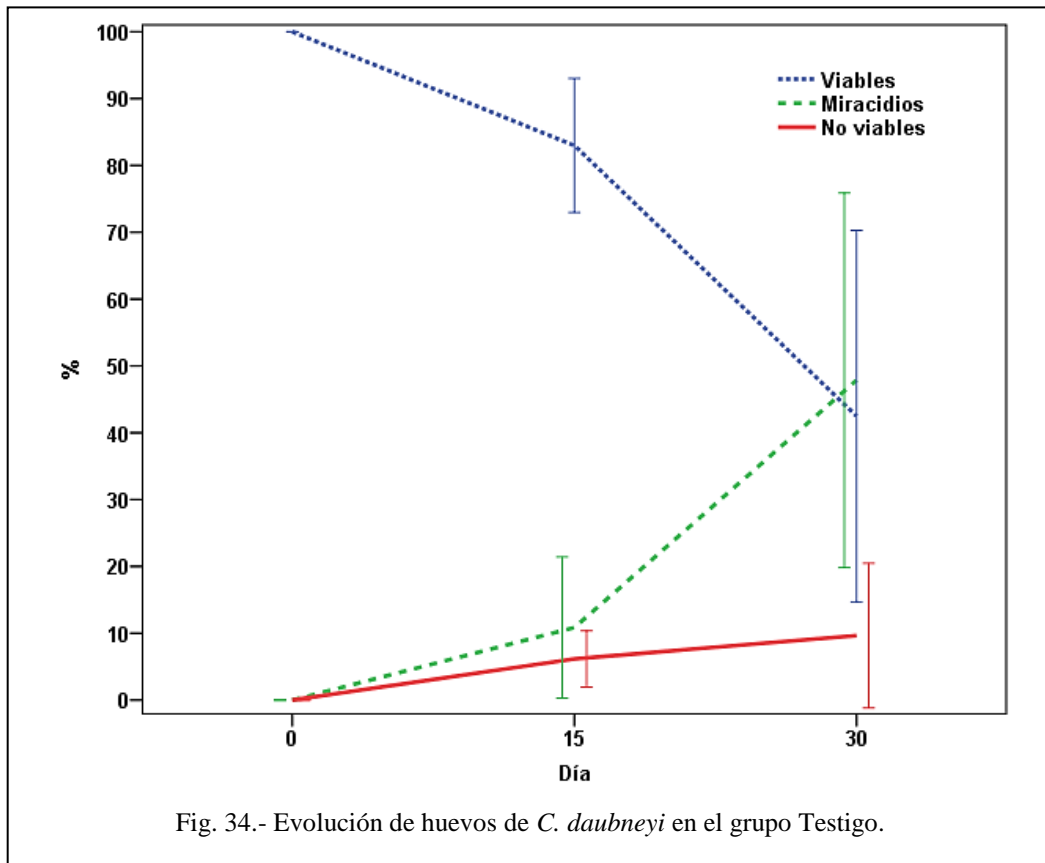
Las cajas se mantuvieron en la explotación durante 30 días, a la sombra. De cada animal, a los 15 días se procesaron por sedimentación una caja testigo y otra tratada con *M. circinelloides*. Bajo el microscopio y en cámara de McMaster, se determinó el porcentaje de huevos viables, no viables, y de miracidios, procediendo para ello al recuento de un número mínimo de 100 huevos, que se clasificaron según el criterio establecido en el apartado 5.3.3.

Los datos recolectados se analizaron mediante “U” de Mann-Whitney, considerando significación estadística si $P < 0,05$ (IBM SPSS Statistics, versión 20.0).

5.3.2. Resultados y Discusión

Como se representa en la Figura 34, el porcentaje de huevos viables en el grupo Testigo descendió a partir de los 15 días, al tiempo que se produjo un incremento significativo del porcentaje de miracidios. Los huevos no viables mantuvieron un valor más o menos constante durante los 30 días de estudio, inferior al 10%.

Al añadir esporas de *M. circinelloides* a las heces que contenían huevos amphistómidos, se observó (Fig. 35) que a los 15 días el porcentaje de huevos viables era próximo al 60%, y a los 30 días del 20%, al igual que el de los miracidios. Más de la mitad de los huevos resultaron no viables.



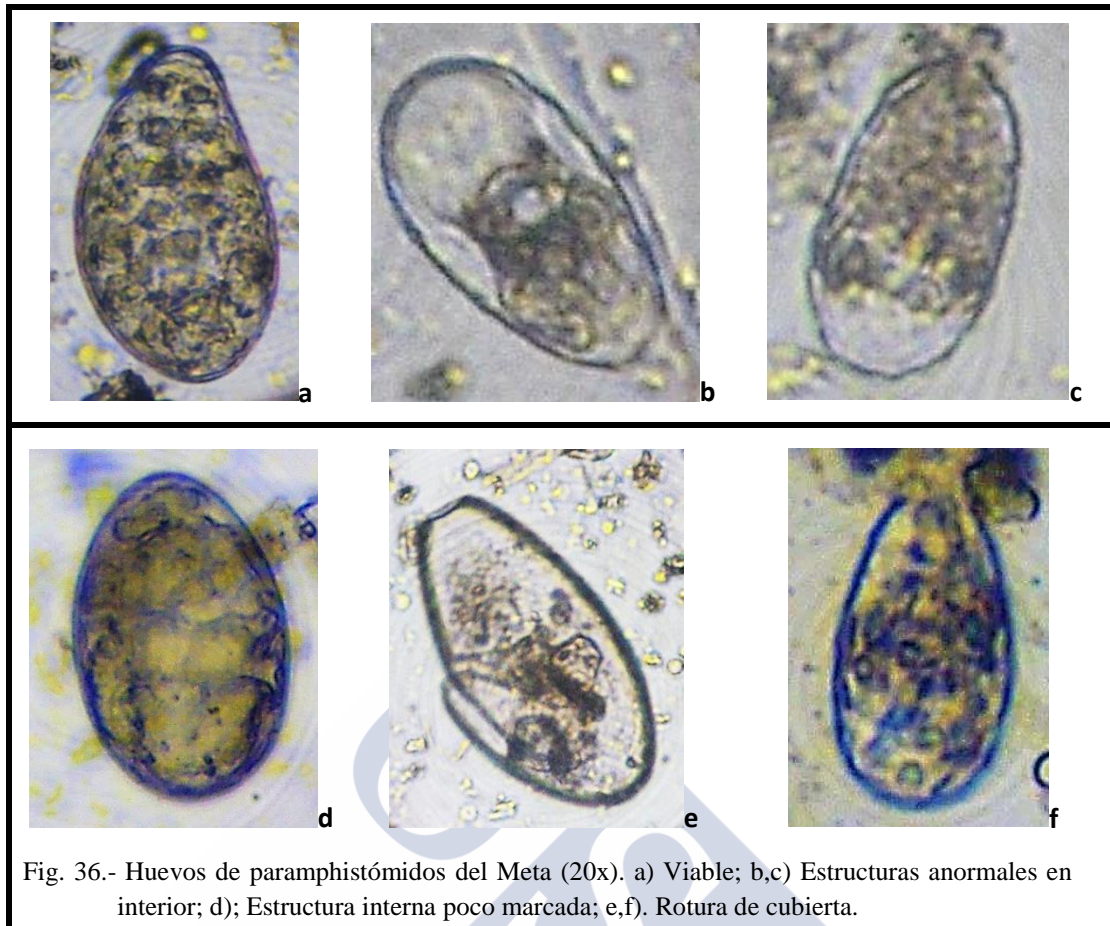


Fig. 36.- Huevos de paramphistómidos del Meta (20x). a) Viable; b,c) Estructuras anormales en interior; d); Estructura interna poco marcada; e,f). Rotura de cubierta.

De la comparación de las figuras 34 y 35 se deduce que la adición de las esporas de *Mucor circinelloides* tuvo un efecto notable sobre la viabilidad de los huevos de paramphistómidos, que como se muestra en la tabla 39, se redujo notablemente a los 15 días del contacto con las esporas de *M. circinelloides*, observándose al final de la prueba (30 días) un porcentaje de huevos no viables significativamente superior al del grupo Testigo ($P < 0,05$).

Tabla 39.- Efecto de la adición de esporas de <i>Mucor circinelloides</i> sobre la viabilidad de huevos de paramphistómidos.						
Día	Viables		Miracidios		No viables	
	15	30	15	30	15	30
<i>M. circinelloides</i>	-25%	-50%	-10%	-52%	+78%	+82%
Estadísticos	U= -2,146 P= 0,024		U= -1,150 P= 0,250		U= -4,872 P= 0,001	

No se obtuvieron diferencias en los porcentajes de miracidios entre ambos grupos, a pesar de que a los 30 días el tratamiento con *M. circinelloides* disminuyó a la mitad los valores de miracidios en relación con el Testigo.

Estos datos confirman la actividad precoz de *Mucor circinelloides* sobre los huevos de paramphistómidos, que a los 14 días resulta en la alteración irreversible de un porcentaje significativamente superior al observado en el grupo Testigo.

Si se comparan los resultados obtenidos en España (Tabla 36) y Colombia (Tabla 37), se deduce que la acción del hongo ovicida es más intensa cuando los huevos se encuentran en las heces y no en medio acuoso. También se puede inferir que aunque el aumento de temperatura favoreció el desarrollo de miracidios en el grupo Testigo (48 en Colombia por 30 en España), el hongo *M. circinelloides* provocó una mayor disminución. La constatación de que el incremento de la temperatura no repercute sobre la actividad ovicida de *Mucor* es un resultado a destacar, puesto que amplía las posibilidades de su empleo no sólo a zonas de clima oceánico como la región en la que se desarrolló por primera vez esta experiencia, sino también a áreas en las que se describen temperaturas más altas durante todo el día, como ocurre en regiones tropicales.

El porcentaje de huevos que permanecían viables después de 29 días en medio acuoso y temperatura de 15-18°C, resultó superior al observado en las heces de los bovinos mantenidas a más de 25°C. En diversos estudios se ha señalado que la formación de la larva ciliada o miracidio en el interior de los huevos de paramphistómidos es un proceso termo-dependiente, de forma que podrían llegar a necesitarse hasta 17 días a 28°C, 20 días a 20°C o 28-30 días a 17°C (Sanabria y Romero, 2008; Dar y cols., 2015).

Si se tiene en cuenta la similitud ya mencionada entre los ciclos externos de *Fasciola hepatica* y de los paramphistómidos, y también entre los huevos de trematodos hepáticos y ruminales, se deduce que *Mucor circinelloides* puede ejercer idéntica actividad antagónica sobre los estadios de ambos parásitos, lo que destaca su utilidad en la disminución del riesgo de infección para animales en pastoreo. En un estudio que consistió en añadir esporas de *M. circinelloides* sobre las heces de terneros que eliminaban huevos de *F. hepatica*, se consiguió limitar la viabilidad de los huevos del trematodo en un 74%, mientras que al administrárselas con el alimento, la reducción fue del 67% (Cortiñas y cols., 2015).

Del análisis combinado de los resultados expuestos en los dos ensayos anteriores se deduce que la desparasitación de los rumiantes con Oxiclozanida, junto con el empleo de esporas del hongo *Mucor circinelloides*, constituyen un procedimiento idóneo para el control integrado de la paramphistomidosis en bovinos de Colombia, aplicable (seguramente que con similares resultados) también al de la fasciolosis. Resta solucionar los aspectos legales relacionados con el registro del antihelmíntico, y de la formulación adecuada de esporas del hongo.

En relación con el primero de los aspectos, ya se están completando ensayos *in vitro* e *in vivo* para establecer qué presentación en términos de vía de administración es la más apropiada para ganado que se mantiene en extensivo. Se contemplan diferentes posibilidades para el registro del empleo de los hongos, desde la posición más sencilla que es la de producto biocida que podría distribuirse sobre las heces, el terreno, etc., hasta aditivo alimentario, opción más complicada porque su posible repercusión sobre algunos alimentos de origen animal obliga a desarrollar una serie de experimentos para descartarla. En este proceso se ha requerido y conseguido la intervención del Instituto Colombiano Agropecuario, que ha señalado diversos puntos clave, entre los que cabe destacar que en Colombia se haya descrito la misma variedad de hongo que se pretende emplear. Cabrera y Chitiva (2001) aislaron e identificaron una cepa de *Mucor circinelloides* del páramo Guasca (Cundinamarca), que depositaron en el Banco Colombiano de cepas, donde se le asignó la denominación SPG321 (Chaparro, 2010).





The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'.

6.- CONCLUSIONES



De la realización del presente trabajo se coligen las siguientes **conclusiones**:

- 1.- En los predios de los departamentos colombianos de Antioquia, Cundinamarca y Meta concurren condiciones que favorecen la fase exógena del ciclo de trematodos (*Fasciola hepatica* y paramphistómidos), lo que representa una importante posibilidad de exposición del ganado bovino a estos trematodos.
- 2.- El riesgo de contacto con trematodos en bovinos de Colombia es elevado, tanto en áreas de clima oceánico, mediterráneo, ecuatorial o tropical.
- 3.- La paramphistomidosis es una enfermedad desconocida y emergente en el ganado vacuno de Colombia, y se requiere la aplicación de un programa integrado de medidas para controlar e intentar reducir su aparición.
- 4.- El consumo de agua procedente de acueductos entraña un riesgo notable de exposición a *Fasciola hepatica* y paramphistómidos entre los bovinos de Colombia.
- 5.- El manejo del ganado vacuno en Colombia no resulta apropiado para evitar el contacto con trematodos hepáticos y ruminales, a pesar de sustentarse en parte en la asistencia técnica de profesionales veterinarios. Resulta necesario reforzar en especial los conocimientos de ganaderos y veterinarios sobre las características que favorecen el desarrollo del ciclo externo de estos parásitos.
- 6.- La administración de antiparasitarios es insuficiente para el control de las trematodosis bovinas en Colombia, y se debe acompañar de medidas que disminuyan la contaminación del medio por metacercarias.
- 7.- La Oxiclozanida presenta una elevada actividad frente a paramphistómidos adultos, y menor frente a los inmaduros, de lo que se deduce la necesidad de repetir el tratamiento a un intervalo de 14-21 días de la primera administración para eliminar las formas juveniles que hayan alcanzado el estadio adulto.

8.- Con el empleo de esporas del hongo *Mucor circinelloides* se dispone de una herramienta muy útil para limitar el desarrollo de los huevos de trematodos en las heces y en el suelo, y disminuir así el riesgo de infección en los rumiantes en pastoreo. La actividad de este hongo no se reduce en áreas tropicales.

9.- La combinación de la administración de Oxiclozanida a bovinos de Colombia, junto con el empleo de esporas de *Mucor circinelloides* sobre las heces de individuos parasitados por trematodos, proporciona una solución integrada para el control de estas infecciones.



7.- CONCLUSIONS





The analysis of the current investigation leads us to the following conclusions:

- 1.- In the farms of the Colombian departments of Cundinamarca, Antioquia and Meta concur conditions that favor the exogenous phase of the life-cycle of flukes (*Fasciola hepatica* and paramphistomids), representing an important risk of cattle exposure to these flukes.
- 2.- Colombian cattle are at an elevated risk of contact with flukes, regardless of being exploited in areas under oceanic, mediterranean, equatorial or tropical climate areas.
- 3.- Paramphistomidosis is an unknown and emerging disease in cattle in Colombia, and the implementation of an integrated program measures to control and to reduce their appearance becomes essential.
- 4.- Water consumption from aqueducts constitutes a significant risk of exposure to *Fasciola hepatica* and cattle paramphistomids in Colombia.
- 5.- Despite it is partly sustained on technical assistance of veterinary professionals, management of cattle in Colombia is not appropriate to avoid contact with liver and ruminal flukes. It seems especially necessary to improve the knowledge of farmers and veterinarians about the factors that favor the development of the external phase of these parasites.
- 6.- Bovine deworming reveals insufficient for the control of trematodoses in Colombia, and should be accompanied by measures to reduce environmental contamination by metacercariae.
- 7.- Oxyclozanide develops high activity against adult paramphistomids but lower against immature stages, thus it is required to repeat the treatment at an interval of 14-21 days of the first administration to remove juveniles that reached the adult stage.

8.- By spreading of spores of the fungus *Mucor circinelloides* onto the faeces and soil provides a very useful tool to reduce the development of trematode eggs, and thus to reduce the risk of infection among grazing ruminants. The fungal activity is not reduced in tropical areas.

9.- Deworming of Colombian cattle with Oxyclozanide, together with pouring spores of *Mucor circinelloides* on the stool of individuals parasitized by trematodes, afford an integrated solution for the control of infection by trematodes.



8.- RESUMEN





La ganadería en Colombia tiene una especial importancia por su aporte al producto interno bruto agropecuario y a la demanda agregada a través del consumo de los hogares. La producción lechera colombiana representa cerca del 1,3% del PIB nacional y 11% del PIB agropecuario, actividad que genera 400.000 empleos. La ganadería vacuna para la producción de carne representa el 16% del valor de la producción agropecuaria y el 37% del pecuario. El inventario ganadero en el año 2015 fue de 22,5 millones de cabezas de ganado, de los cuales el 57,2% se destinaba a la producción de carne, 3,3% a la producción de leche, y 39,5% para el doble propósito. Se estima que el ganado vacuno pastorea 36,1 millones de hectáreas que corresponde al 57,2% de la superficie agropecuaria colombiana, con una capacidad de carga de 0,66 animales / Ha que señala la predominancia de sistemas de producción en extensivo.

Entre las enfermedades que afectan al ganado bovino en pastoreo destacan la fasciolosis y las paramphistomosis, trematodosis que pueden desarrollarse si en el medio existen hospedadores intermediarios, caracoles del género *Lymnaea*. En las ganaderías de Colombia, principalmente en zonas lecheras de clima frío, es muy común la presentación de fasciolosis, lo que hace que en algunos casos los ganaderos apliquen fasciolicidas de manera un poco indiscriminada. Por el contrario, prácticamente se desconoce la infección por trematodos ruminales paramphistómidos.

El control eficaz de las trematodosis requiere del diseño y aplicación de un programa integrado, en el que habría que incluir la aplicación estratégica de antihelmínticos para eliminar los trematodos de los hospedadores definitivos y prevenir la contaminación del ambiente, y medidas para reducir el número de caracoles hospedadores intermediarios, y de este modo limitar el riesgo de infección durante el pastoreo.

Con objeto de adquirir información acerca de la exposición del ganado bovino de Colombia a los trematodos *Fasciola hepatica* y paramphistómidos, se desarrolló un **primer ensayo** que consistió en la realización de una encuesta seroepidemiológica en la que se recogieron muestras de sangre de explotaciones de los departamentos de Cundinamarca (374 muestras), Antioquia (341 muestras) y el Meta (311 muestras), que posteriormente se analizaron mediante un ELISA, el antígeno recombinante FhrAPS (*F. hepatica*) y el complejo proteico CdP1 (*C. daubneyi*). Los valores de seroprevalencia individual de anticuerpos frente al trematodo hepático resultaron del 40% en Cundinamarca, 65% en Antioquia y 31% en el Meta. El análisis de los datos por explotaciones mostró una gran distribución, y la seropositividad fue del 93% en Cundinamarca, 83% en Antioquia, y 93% en el Meta.

En relación con la presencia de anticuerpos frente a paramphistómidos, el 58% de las muestras de Cundinamarca fueron positivas, por el 28% en Antioquia y el 27% en el Meta. El análisis por explotaciones mostró seropositividad en el 97% de las granjas de Cundinamarca, 67% en Antioquia y 64% en el Meta.

Teniendo en cuenta la raza de los bovinos, en Antioquia se observaron los valores más elevados de seroprevalencia frente a *Fasciola hepatica* en los vacunos **Holstein** (66%), y frente a paramphistómidos en los **cruces de Holstein y Jersey** (100%) y en los **Jersey** (80%), pero sólo se demostró significación estadística para el trematodo gástrico ($\chi^2= 12,102$, $P= 0,002$). En el Meta se comprobaron diferencias significativas en la seropositividad al FhrAPS-ELISA ($\chi^2= 35,392$, $P= 0,001$), con los valores más elevados en los individuos Brangus (70%) y Holstein (55%). También se demostró significación en la seroprevalencia con el CdP1-ELISA ($\chi^2= 29,014$, $P= 0,001$), con Brangus y Holstein alcanzando los mayores porcentajes (50% y 45%, respectivamente).

Una vez establecidas las seroprevalencias de fasciolosis y de paramphistomidosis, el siguiente paso consistió en el estudio de la infección simultánea por ambos trematodos. En Cundinamarca, la sensibilización frente a *F. hepatica* y paramphistómidos resultó del 29%, mientras que el 32% nunca estuvieron en contacto con alguno de los dos trematodos. En Antioquia se señaló la presencia de exposición a alguno de los trematodos en el 86% de los rumiantes, por un 15% de reses que exhibieron anticuerpos que reaccionaron con los antígenos de ambos parásitos. Se detectaron bovinos seropositivos a los dos trematodos en el 14% de las muestras analizadas procedentes del Meta, en tanto que el 55% resultaron negativos a las pruebas inmunoenzimáticas.

Una posible explicación a los resultados obtenidos pasa por señalar que en todas las áreas estudiadas se dan las condiciones edafoclimáticas adecuadas para el desarrollo de la fase externa del ciclo biológico de los trematodos *Fasciola hepatica* y paramphistómidos.

En el **segundo ensayo** de la presente investigación se estudió qué influencia podría ejercer el manejo de los bovinos sobre su exposición a los trematodos y posterior desarrollo de respuesta inmunitaria humoral. Para ello, se distribuyó entre los encargados/capataces de cada explotación una encuesta en la que se recababa información acerca de las características de los prados, origen del agua de bebida, eliminación de excretas, nivel de conocimiento de los propietarios sobre las trematodosis, realización de análisis coprológicos periódicos o tratamiento antiparasitario.

En Cundinamarca se demostró **mayor riesgo de exposición a *F. hepatica*** en las explotaciones con una superficie de pasto inferior a 50 Ha en la que se alimentaban de 51 a 150 vacas en ordeño, y que bebían en quebradas. Se comprobó un mayor riesgo en los predios que no contaban con asistencia técnica veterinaria, que no realizaban análisis coprológicos rutinarios. En relación con el control parasitario, se estableció relación entre la administración de antiparasitarios en el secado y en el parto, cuando se estimaba la dosis visualmente o con criterios diferentes al peso del animal, que no seguían rotaciones, y que tampoco solicitaban la valoración de los tratamientos administrados.

Los bovinos de raza *Bos taurus* de Antioquia, alimentados en praderas de hasta 100 Ha, en las que no existían caños permanentes o sistemas de drenaje, ni se eliminaba el estiércol, alcanzaron los valores más elevados de seropositividad. Este resultado también se observó cuando se administraba abamectina + triclabendazol en el secado.

El riesgo más elevado de exposición a *F. hepatica* en el Meta se detectó entre los bovinos Angus y Holstein que pastaban áreas de hasta 200 Ha con sistemas de drenaje y bebían de pozos o acueductos. Se trataba de granjas cuyos encargados admitieron conocer la fasciolosis, asignarle una importancia leve y solicitar análisis coprológicos previos. En relación con el tratamiento antiparasitario, la administración de Ivermectina + Fenbendazol en un sistema de rotación de fármacos, se relacionó con una mayor seroprevalencia.

El análisis del efecto del manejo de los rumiantes sobre la exposición a paramphistómidos en Cundinamarca indicó un mayor riesgo en aquellos que tomaban el agua de acueductos, y que afirmaban cumplir con las indicaciones de los veterinarios, aunque no realizaban análisis coprológicos. El tratamiento con Avermectinas + Salicilanilidas + Bencimidazol, o con Bencimidazol solo, durante la fase de secado, dosificados según el peso u otros criterios se relacionaron con una mayor seroprevalencia de anticuerpos frente al trematodo gástrico.

Los bovinos de raza *Bos taurus*, Brangus y cruce de Holstein con Jersey de Antioquia, pastando extensiones de 101-150 Ha en las que las heces se almacenan en un estercolero y presentaban caños permanentes y sistemas de drenaje, exhibieron una mayor probabilidad de exposición a trematodos gástricos. Este resultado también se mostró en rumiantes desparasitados con fenbendazol o triclabendazol. En el Meta, el mayor riesgo de exposición a paramphistómidos se definió entre bovinos Brangus y Holstein, mantenidas en superficies inferiores a 200 Ha, que recibían ivermectina cada seis meses.

En la realización de los dos ensayos anteriores se constató que entre ganaderos y veterinarios en Colombia existe un importante nivel de información acerca del control de la fasciolosis, pero escaso sobre la paramphistomidosis, haciéndose muy evidente en las posibilidades del tratamiento de los hospedadores definitivos. Considerando además que ambos trematodos desarrollan una fase externa del ciclo idéntica, se planteó un **tercer estudio** para el control integrado de trematodosis en ganado vacuno. En concreto, se diseñó un procedimiento orientado al control de la infección por paramphistómidos basado I) en el tratamiento de los bovinos con compuesto a base de Oxiclozanida + Ivermectina, y II) en la reducción de la viabilidad de huevos de paramphistómidos en el medio, a través del empleo de esporas del hongo ovidica *Mucor circinelloides* (cepa CECT 20824).

Se evaluó la eficacia de tres formulaciones (inyectable, oral y *pour on*) del antihelmíntico sobre bovinos que eliminaban huevos del trematodo gástrico en las heces, y también sobre rumiantes negativos a la coprología al inicio del estudio. El efecto antiparasitario se estableció con la estimación de los índices FECR (*Faecal Egg Count Reduction*) y RAP (Reducción de Animales Positivos por coprología). De este modo se mostró una acción más precoz con la aplicación oral, alcanzándose un valor de 100% para ambos índices a los 15 días post-tratamiento, por un 17% por vía inyectable y 89% mediante aplicación tópica. Sin embargo, a los 30 días la eficacia resultó del 25-50% por vía oral (FECR, RAP), y 100% (FECR, RAP) por vía inyectable o tópica. Estos datos parecen señalar que la administración oral no eliminó las formas inmaduras del trematodo ruminal, que completaron su desarrollo hasta adultos.

En los rumiantes negativos al inicio del estudio se observó que ninguno de los que se desparasitaron por vía oral eliminaron huevos de paramphistómidos, por el 9% (día 15) y 18% (día 30) vía inyectable y el 25% vía tópica. El 20% de los individuos del grupo Testigo (no tratado) fueron positivos a la coprología a los 15 y 30 días. Estos resultados indican que la administración oral de Oxiclozanida en una sola toma proporciona una eficacia muy elevada frente a los paramphistómidos adultos a los 15 días post-tratamiento, pero sería aconsejable aplicar otra a un intervalo de 15-21 días para eliminar aquellos trematodos juveniles que sobrevivieron al tratamiento y se convirtieron en adultos.

Para contribuir al control integrado de los parásitos, es preciso disponer de herramientas que reduzcan su viabilidad en el medio, y así limitar el riesgo de infección de los animales. En el presente trabajo se optó por el empleo de esporas del hongo *Mucor circinelloides*. Se trata de una especie saprofita aislada del suelo de explotaciones agropecuarias y de las heces de diferentes especies animales. Este hongo se nutre de materia orgánica en descomposición, pero si detecta en las

proximidades la presencia de huevos de parásitos, desarrolla hifas que se adhieren a su cubierta, penetran al interior y finalmente digieren su embrión.

Se desarrolló un estudio acerca de la utilidad del empleo de esporas de *M. circinelloides* para disminuir la viabilidad de huevos de trematodos. En concreto, se seleccionaron los de paramphistómidos, porque apenas existe información disponible, y por el carácter emergente de la paramphistomidosis en Colombia. El primer ensayo consistió en exponer los huevos de *Calicophoron daubneyi* obtenidos a partir de vacas Holstein de una explotación de Riotorto (Lugo, España), a la acción de las esporas de *M. circinelloides* en solución acuosa, bajo condiciones de temperatura de 15-18°C. De este modo, se consiguió que el porcentaje de viabilidad disminuyera desde el día 4 hasta el día 29, en que menos de la mitad de los huevos se mantenían viables. En comparación con el grupo Testigo (sin esporas), se demostró que los huevos no viables aumentaban en un 59% (día 14) y un 69% (día 29), mientras que los miracidios disminuían en un 43%.

Puesto que los huevos de los trematodos son eliminados al exterior junto con las heces, que se pueden encontrar a temperaturas más elevadas, se decidió repetir el ensayo en Villavicencio (Meta, Colombia) directamente sobre las heces de bovinos que excretaban huevos de paramphistómidos, manteniéndolas a una temperatura media de 25°C. Con este procedimiento se observó a los 15 días un porcentaje de huevos viables próximo al 60%, y a los 30 días del 20%, al igual que el de los miracidios. Al final del ensayo (día 30), más de la mitad de los huevos resultaron no viables. Si se comparan los resultados así obtenidos con los del grupo Testigo, se comprobó un número de huevos no viables un 78-82% superior, y que los huevos viables se reducían a la mitad, al igual que el porcentaje de miracidios. Estos datos confirman la actividad precoz de *Mucor circinelloides* sobre los huevos de paramphistómidos, que a los 14 días resulta en la alteración irreversible de un porcentaje significativamente superior al observado en el grupo Testigo.

De la comparación de los resultados obtenidos en España y en Colombia se deduce una acción ovicida más intensa cuando los huevos se encuentran en las heces y no en medio acuoso. También se constató que el incremento de la temperatura no repercute sobre la actividad ovicida de *Mucor*, que indica que se podría emplear tanto en zonas de clima oceánico como en áreas cálidas de clima tropical.

Si se tiene en cuenta la similitud entre los ciclos externos de *Fasciola hepatica* y de los paramphistómidos, y también entre los huevos de trematodos hepáticos y ruminales, se deduce que *Mucor circinelloides* puede ejercer idéntica actividad antagónica sobre los estadios de ambos

parásitos, lo que destaca su utilidad en la disminución del riesgo de infección para animales en pastoreo.

Del análisis combinado de los resultados expuestos se concluye que en los departamentos colombianos de Antioquia, Cundinamarca y Meta se dan las condiciones favorables para el desarrollo de la fase exógena del ciclo de trematodos (*Fasciola hepatica* y paramphistómidos). Teniendo en cuenta las diferencias entre estos departamentos, se deduce que existe un riesgo elevado de contacto con trematodos, tanto en áreas de clima oceánico, mediterráneo, ecuatorial o tropical, que se acrecienta si los bovinos beben de acueductos. El manejo del ganado vacuno no es apropiado para evitar el contacto con trematodos hepáticos y ruminales, por lo que sería interesante reforzar los conocimientos de ganaderos y veterinarios sobre las características que favorecen el desarrollo del ciclo externo de estos parásitos. Si se combina la desparasitación de los rumiantes con Oxiclozanida, junto con el empleo de esporas del hongo *Mucor circinelloides*, se dispone de un procedimiento idóneo para el control integrado de la paramphistomidosis en bovinos de Colombia, aplicable (seguramente que con similares resultados) también al de la fasciolosis.



8.- SUMMARY





Livestock is particularly important in Colombia for its contribution to the agricultural Gross Domestic Product (GDP) and to aggregate through household consumption demand. Dairy production in Colombia accounts for about 1.3% of national GDP and 11% of agricultural GDP, activity that generates 400,000 jobs. Beef cattle for meat production represent 16% of the value of agricultural production and 37% of the livestock. The cattle inventory in 2015 was 22.5 million head of cattle, of which 57.2% was for meat production, 3.3% in milk production, and 39.5% for the dual purpose. It is estimated that cattle grazes 36.1 million Ha, corresponding to 57.2% of the Colombian agricultural area, thus a capacity of 0.66 animals / Ha points the predominance of extensive production systems.

The diseases that affect cattle grazing include fascioliasis and paramphistomidosis, trematodoses that can develop if there are intermediate hosts, snails of the genus *Lymnaea* in the environment (soil). In herds in Colombia, mainly located under dairy cold climates, it is very common to find *Fasciola*-infected cows, which in some cases farmers try to solve by applying fasciolicides too frequently. By contrast, the infection by ruminal trematodes (paramphistomids) is seldom known.

Successful control of trematodoses needs for an accurate design and implementation of an integrated program, which should include the strategic application of anthelmintic to eliminate the flukes of the definitive hosts and prevent the contamination of the environment, and actions to reduce the number of snails intermediate hosts, and thus to limit the risk of infection during grazing.

In order to acquire information about the exposure of cattle from Colombia to the trematodes *Fasciola hepatica* and paramphistomids, a **first test** consisting of performing a sero-epidemiological survey of blood samples collected in ruminants from farms in the department of Cundinamarca (374 samples), Antioquia (341 samples) and Meta (311 samples). Sera were subsequently analyzed by ELISA, the recombinant antigen FhrAPS (*F. hepatica*) and the CdP1 protein complex (*Calicophoron daubneyi*: Paramphistomidae). The values of individual seroprevalence of antibodies against the liver fluke were 40% in Cundinamarca, 65% in Antioquia 65% and 31% in Meta. Analysis of the data at a farm-level showed a large distribution (93% in Cundinamarca, 83% in Antioquia and 93% in Meta). Regarding the presence of antibodies to paramphistomids, 58% of Cundinamarca samples were positive, by 28% in Antioquia and 27% in Meta. The analysis showed seropositivity in 97% of farms in Cundinamarca, 67% in Antioquia and 64% in Meta.

According to the breed cattle, in Antioquia the highest seroprevalence against *Fasciola hepatica* was observed in Holsteins (66%), and against paramphistomids among the Holstein x Jersey (100%) and Jersey (80%), but significant difference was demonstrated only for the ruminal trematode ($\chi^2=$

12.102, $P= 0.002$). Statistical differences in seropositivity from Meta by using the FhrAPS-ELISA were shown ($\chi^2= 35.392$, $P= 0.001$), with the highest values in the Brangus (70%) and Holstein (55%) individuals. A significantly higher seroprevalence with CdP1-ELISA was detected in Brangus and Holstein cows (50% and 45%, respectively) ($\chi^2= 29.014$, $P= 0.001$).

Once established the seroprevalence of fasciolosis and paramphistomidosis, the next step was to study the simultaneous infection by both trematodes. In Cundinamarca, sensitization against *F. hepatica* and paramphistomids was 29%, while 32% were never in contact with any of the two flukes. In Antioquia, exposure to any of the flukes was found in 86% of ruminants, by 15% of cattle double positive. Cattle positive to both flukes were detected in 14% of the samples analyzed from the Meta, while 55% were negative to the immunoassays. One possible explanation to the results obtained encompasses that appropriate conditions for the external phase of the life cycle of *Fasciola hepatica* and paramphistomids occur in the soil and climatic conditions.

In the **second trial** of this research, the possible influence of management of cattle on their exposure to flukes and further development of humoral immune response have been considered. With this aim, a survey was distributed to managers / foremen in which information about the characteristics of the grasslands, source of drinking water, sewage disposal, level of knowledge of the owners about the trematodosis, realization of periodical stool analysis or deworming was recorded.

An elevated risk of exposure to *F. hepatica* was demonstrated on farms from Cundinamarca with an area of less than 50 hectares in grass that fed 51 to 150 milking cows, and drank in streams. The risk increased on the grounds where they had no veterinary technical assistance, which did not perform routine stool analysis. Regarding parasite control, relationship was established between deworming during the non-lactating period, when the dose is estimated visually or with criteria different to the weight of the animal, who did not follow rotations, nor requested the assessment of administered treatment.

Bos taurus cattle from Antioquia feeding on meadows up to 100 Ha, in which there were no permanent pipes or drainage systems, and manure was removed, reached the highest seropositivity values to *F. hepatica*. This result was also observed when administered Abamectin + Triclabendazole during the dry period.

The highest risk of exposure to *F. hepatica* in Meta was detected among Angus and Holstein cattle grazing areas up to 200 Ha, with drainage systems and drinking wells or aqueducts. It was admitted

farms whose managers know fasciolosis, assign a minor importance and stool analysis prior request. Regarding deworming, administration of Ivermectin + Fenbendazol in a rotation system drugs, was associated with a higher seroprevalence.

The analysis of the effect of management of ruminants on exposure to paramphistomids in Cundinamarca indicated an increased risk in those who drank water from aqueducts, and who claimed to meet the indications of veterinarians, but did not perform stool analysis. Higher prevalence of antibodies against ruminal trematodes was linked to the treatment with Avermectins + Salicylanilides + Benzimidazole, or Benzimidazol only during the dry phase, and dosage according to weight or other criteria.

In Antioquia, greater likelihood of exposure to gastric flukes was found among cattle breeds belonging to *Bos taurus*, Brangus and Holstein x Jersey Antioquia, grazing extensions of 101-150 Ha, where faeces are stored in a dunghill, and permanent pipes and drainage systems are present. This result was also shown in ruminants dewormed with Fenbendazole or Triclabendazole. In Meta, the greatest risk of exposure to paramphistomids were detected among Brangus and Holstein cattle, maintained at less than 200 Ha and receiving Ivermectin every six months.

After carrying out the above two tests, it was found that farmers and veterinarians from Colombia acquired a significant level of information about controlling fasciolosis, but sparse on paramphistomidosis, becoming very evident in the possibilities of treatment of the definitive hosts. By considering that both flukes develop a similar external phase in the life-cycle, a **third study** was designed for the integrated control of cattle trematodoses. Specifically, the procedure was focused to paramphistomids and consisted of I) deworming cattle with a compound based on Oxyclozanide 20% + Ivermectin 0.5%, and II) in reducing the viability of eggs of paramphistomids in the environment, through the addition of spores of the ovicidal fungus *Mucor circinelloides* (strain CECT 20824).

The efficacy of three anthelmintic formulations (injection, oral and pour on) was assessed on cattle passing eggs of ruminal flukes in faeces, and also on coprologically-negative ruminants. The parasiticide effect was measured by estimating the FERC (Faecal Egg Count Reduction) and RAP (Reduction of Animals Positives by coprología) indices. An earlier action was shown after the oral administration, reaching a value of 100% for both indices 15 days after treatment, by 17% after injectable administration and 89% by topical application. However, the efficacy was 25-50% (FERC, RAP) 30 days after the oral administration, and 100% (FERC, RAP) by injection or topically. These data

seem to indicate that oral administration did not eliminate the immature ruminal trematodes, and then the adult stage was reached.

In the ruminants initially negative by copromicroscopical analysis, it was observed that none of the oral-treated animals shed eggs of paramphistomids, by 9% (day 15) and 18% (day 30) via injection and 25% topically. Twenty percent of the individuals in the Control group (untreated) were positive at 15 and 30 days. These results indicate that administration of Oxyclozanide in one shot provides a very high effectiveness against adult paramphistomids at 15 days post-treatment, but it would be advisable to apply another at an interval of 15-21 days to remove those juvenile flukes that survived the treatment and became into adults.

Integrated control of parasites requires for tools that reduce their viability in the environment, and thus limit the risk of animal infection. In this paper we proposed the use of spores of the fungus *Mucor circinelloides*, a saprofito species isolated from farms soil and faeces of different animal species. This fungus thrives on decaying organic matter, but if detected parasite eggs in the vicinity, hyphae develop and attach to the egg-shell, penetrate and finally digest their embryo.

A study was developed concerning the usefulness of using spores of *M. circinelloides* to reduce the viability of trematode eggs. Specifically, those of paramphistomids were selected because there is little information available, as well as the emerging nature of the paramphistomidosis in Colombia. The first test consisted of exposing *Calicophoron daubneyi* eggs obtained from Friesians in Riotorto (Lugo, Spain), to the action of the fungal spores in an aqueous solution under a temperature of 15-18°C. Thus, the percentage of egg viability reduced from day 4 to 29, in which less than half of the eggs remain viable. Compared with the control group (no spores), it was shown that non-viable eggs increased by 59% (day 14) and 69% (29), while the miracidia decreased by 43%.

Since egg flukes are eliminated to the environment along with the faeces, which can be found at higher temperatures, it was decided to repeat the test in Villavicencio (Meta, Colombia) directly onto the faeces of cattle excreting eggs paramphistómidos, keeping at an average temperature of 25°C. This procedure provided a percentage of 60% viable eggs after 15 days, and 20% after 30 days, as recorded for the miracidia. At the end of the test (day 30), more than half of the eggs were not viable. By comparing the results with the control group, a number of non-viable eggs higher than 78-82% were found, and viable eggs were reduced by half, as the percentage of miracidia. These data confirm that the early activity of *Mucor circinelloides* on eggs of paramphistomids at day 14 results in the irreversible damage of a significantly higher percentage than in the Control group.

After the comparison of the results obtained in Spain and Colombia, the ovicidal action was more intense when eggs were found in the faeces. It was also found that the increment in the temperature has no effect on the ovicidal activity of *Mucor*, indicating that could be used both in areas of oceanic climate and warm areas of tropical climate.

Taking into account the similarity between the external cycles of *Fasciola hepatica* and paramphistomids, and also between the eggs of liver and ruminal flukes, it is considered that *Mucor circinelloides* might have identical antagonistic activity on the stages of both parasites, highlighting its usefulness in reducing the risk of infection in grazing animals.

The analysis of the results led us to conclude that favorable conditions exist in the Colombian departments of Antioquia, Cundinamarca and Meta for the development of the exogenous phase of flukes (*Fasciola hepatica* and paramphistomids). Given the differences between these departments, a high risk of contact with flukes can occur both in areas of oceanic, mediterranean, equatorial or tropical climate, which is increased if cattle drink from aqueducts. Cattle management is not appropriate to avoid contact with liver and rumen flukes, so it would be interesting to reinforce the knowledge of farmers and veterinarians on the characteristics that favor the development of the external cycle of these parasites. If deworming ruminants with Oxyclozanide is combined with the use of spores of the fungus *Mucor circinelloides*, there is a suitable procedure for integrated control of paramphistomidosis in cattle in Colombia, applicable (surely with similar results) also to fasciolosis.





9.- BIBLIOGRAFÍA



- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. (1997). *Paramphistomum daubneyi*: the development of redial generations in the snail *Lymnaea truncatula*. Parasitol Res. 83: 64-69.
- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. (2000). A field study of natural infections in three freshwater snail with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in Central France. J Helminthol. 74: 189-194.
- Aguirre DH, Viñabal AE, Gaido AB. (1998). Comparación de tres técnicas coprológicas para el diagnóstico de *F. hepatica* en rumiantes. Vet Argentina 15: 421-427.
- Alarcón JC, Pabón JD. (2013). El cambio climático y la distribución espacial de las formaciones vegetales en Colombia. Col Forest. 16: 171-185.
- Alarcón EP, Velásquez LE. (2009). Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 22: 168-177.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Araújo DM, Ferreira SR, Soares FE, Benjamin LA. (2012). Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. Res Vet Sci. 93: 803-806.
- Arias Vázquez MS. (2007). Obtención de proteínas recombinantes útiles para el diagnóstico de fasciolosis ovina. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela. España.
- Arias M, Piñeiro P, Hillyer GV, Suárez JL, Francisco I, Cortiñas FJ, Pedreira J, Francisco R, Mochales E, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2010). An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle-management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. J Parasitol. 96: 626-631.
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. Vet Rec. 168: 408.
- Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Suárez J, Miguélez S, Francisco I, Arroyo FL, Suárez JL, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Mendoza De Gives P. (2013a). Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2013/567876
- Arias MS, Sanchís J, Francisco I, Francisco R, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Cortiñas FJ, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2013b). The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle. Vet Parasitol. 197: 126-129.

- Arias MS, Cazapal-Monteiro C, Miguélez S, Hernández JÁ, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2015a). El control biológico de los parásitos en la ganadería bovina, fundamentos y posibilidades reales. X Latin American Veterinary Conference, Lima (Perú), 21-24 abril.
- Arias MS, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JÁ, Suárez J, Francisco I, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A. (2015b). Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. J Sci Tech Environ. 5; Article ID 3000249.
- Arroyo FL, Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JÁ, Suárez J, Miguélez S, Romasanta A, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2016). The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. Biol Control 92: 38-44.
- Athar LA, Khan MN, Sajid MS, Rehman TU, Khan IA. (2011). Cost benefits analysis of anthelmintic treatment of cattle and buffaloes. Pak Vet J. 31: 149-152.
- Barron GL. (1977). The nematode-destroying fungi. Topics in Mycobiology, no. 1. Guelph: Canadian Biological Publications.
- Becerra RWM. (2001). Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. Rev Col Cienc Pec. 14: 28-35.
- Benavides OE. (1996). Diseño de planes racionales de control de parásitos internos de los rumiantes con base en los resultados de investigaciones sobre su dinámica poblacional. En: Quirós JE, López G (Editores), Epidemiología, Diagnóstico y Control de Enfermedades Parasitarias en Bovinos: 79-88.
- Benavides OE, Romero NA. (2001). El control de los parásitos internos en el ganado en los sistemas de pastoreo en el trópico colombiano. Carta FEDEGÁN N° 71: 88-111
- Berlin A, Yodaiken RE, Henman BA. (1984). Assessment of toxic agents at the workplace. Roles of ambient and biological monitoring. Actas del Seminario Internacional celebrado en Luxemburgo, 8-12 de diciembre de 1980. Lancaster, Reino Unido: Martinus Nijhoff.
- Bloemhoff Y, Danaher M, Andrew Forbes, Morgan E, Mulcahy G, Power C, Sayers R. (2014). Parasite control practices on pasture-based dairy farms in the Republic of Ireland. Vet Parasitol. 204: 352-363.
- Bonilla Quintero, Rodrigo (2013). Estudio de las trematodosis del ganado vacuno en la región de la Sabana de Bogotá (Colombia). Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Bonilla R, Miguélez S, Sanchís J, Arroyo FL, Ramírez M, Hernández JÁ, Francisco R, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2015). Relación entre agua de bebida, manejo del estiércol y

- riesgo de infección por *Fasciola hepatica* en vacuno lechero del centro de Colombia. AIDA: 182-184.
- Braga FR, Araújo JV, Soares FE, Araujo JM, Ferreira SR, Tavela AO, Silveira WF, Queiroz JH. (2013). Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. Rev Bras Parasitol Vet. 22: 143-146.
- Braga FR, Araújo JV, Soares FE, Araujo JM, Genier HL, Silva AR, Carvalho RO, Queiroz JH, Ferreira SR. (2011). Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomins. J Helminthol. 85: 164-170.
- Brunori A, Buischio A, Cassinis A. (1985). Introduzione allo studio dei funghi. Casa Editrice "Il Libro" – Italia.
- Cabra A, Herrera C. (2007). Estudio de prevalencia de *Fasciola hepatica* y caracol *Lymnaea* spp. en predios del municipio de Simijaca Cundinamarca. Trabajo de Grado, Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Cabrera C, Chivita A. (2001). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos del suelo del páramo de Guasca (Colombia) en zona de vegetación de frailejones. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá Colombia.
- Camargo M, Camacho M. (1999). Prevalencia de la *Fasciola hepatica* en la zona cálida de los municipios de Cúcuta, Villa del Rosario y Puerto Santander. Tesis de Grado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Bogotá, Colombia.
- Cazapal Monteiro C, Hernández JÁ, Miguélez S, Arroyo FL, Bonilla R, Francisco I, Sánchez-Andrade R, Paz Silva A, Arias MS. (2014). Hongos telúricos: hacia la prevención de trematodosis en ganado vacuno. XIX Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina, Oviedo, 25-27 junio.
- Cazapal-Monteiro CF, Hernández JÁ, Arroyo FL, Miguélez S, Romasanta Á, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2015). Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. Parasitol Res. 114: 2443-2450.
- Chaparro A. (2010). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

- Charlier J, De Cat A, Forbes A, Vercruyse J. (2009). Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. *Vet Parasitol.* 166: 235-240.
- Charlier J, Levecke B, Devleeschauwer B, Vercruyse J, Hogeveen H. (2012b). The economic effects of whole-herd versus selective anthelmintic treatment strategies in dairy cows. *J Dairy Sci.* 95: 2977-2987.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. (1992). WAAVP methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasit.* 44: 35-44.
- Cooper KM, Whelan M, Kennedy DG, Trigueros G, Cannavan A, Boon PE, Wapperom D, Danaher M. (2012). Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 29: 746-760.
- Cortiñas FJ, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Suárez J, López de Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A, Arias M.S. (2015). Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. *Bio Sci Tech.* 25: 1443-1452.
- Cringoli G, Rinaldi L. (2013). Helminth-Trematode: *Dicrocoelium dendriticum*. En: Yasmine Motarjemi (Editor), *Encyclopedia of Food Safety*, vol. 1: Foodborne diseases.
- Cubides JA, Ortíz Ortega D, Martínez R, Pedraza A. (2011). Comparación de tres métodos (Dennis, Elisa y PCR) para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en una zona endémica de la sabana de Bogotá. *Rev Colom Cienc Pecu.* 24: 3.
- Dar Y, Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. (2015). *Pseudosuccinea columella*: age resistance to *Calicophoron daubneyi* infection in two snail populations. *Parasite.* 22: 6. doi: 10.1051/parasite/2015003.
- De Araújo HM, Guimarães MP. (1992). *Cotylophoron travassosi* sp. n. (Trematoda-Paramphistomidae) from cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz;* 87: 69-72.
- De Carvalho RR, Maldonado A Jr, Oliveira-Filho EC, Ribeiro AC, Paumgarten FJ, Rey L. (1998). Effects of *Euphorbia milii* látex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. *Mem I Oswaldo Cruz.* 93: 235-237.
- Dias AS, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Puppim AC, Fernandes FM, Ramos RF, Bertonceli RM, Da Silva RG, Perboni WR. (2012). Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitol Res.* 110: 663-667.

- Dias AS, Araújo JV, Braga FR, Puppim AC, Perboni WR. (2013). *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitol Res.* 112: 2131-2136.
- Diéguez Fernández L, Abreu Guirado O, Piña Pérez M, Vásquez Capote R, Fimia Duarte R, Rodríguez De La Vega R. (2012). Actividad molusquicida *in vitro* de *Momordica charantia* L. (Cundeamor) contra *Fossaria cubensis* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae). *REDVET* 13, Nº 04B. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040412B.html>
- Dorny P, Stoliaroff V, Charlier J, Meas S, Sorn S, Chea B, Holl D, Van Aken D, Vercruyse J. (2011). Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Vet Parasitol.* 175: 293-299.
- Eduardo S. (1985). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. III Revision of the genus *Cotylophoron* Stiles & Goldberger, 1910. *Syst Parasitol.* 7: 3-26.
- EMA (2014). Reflection paper on anthelmintic resistance. European Medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/04/WC500165561.pdf
- Fairweather I, Boray JC. (1999). Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J.* 158: 81-112.
- FEDEGAN. (2007). Análisis político, económico y social del país. Bogotá, Colombia. Federación Nacional de Ganaderos. <http://www.fedegan.org.co/pensamiento-economico-y-social-de-fedegan-2006-2007>.
- Fernández S, Saumell C. (2012). Biological control of parasites in veterinary medicine. En: Paz-Silva A, Arias A (Editores), *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers (USA). 309-340.
- Fitz-Aranda JA, Mendoza-de-Gives P, Torres-Acosta JF, Liébano-Hernández E, López-Arellano ME, Sandoval-Castro CA, Quiroz-Romero H. (2015). *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in nutritional pellets: effect of storage time and conditions on the trapping ability against *Haemonchus contortus* larvae. *J Helminthol.* 89: 131-138.
- Fuertes M, Pérez V, Benavides J, González-Lanza MC, Mezo M, González-Warleta M, Giráldez FJ, Fernández M, Manga-González MY, Ferreras MC. (2015). Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. *Vet Parasitol.* 209: 188-196.
- Galvis JD, Parra GD, Hernández de Galvis AL. (1984). Comprobación de la paramfistomiasis ovina en Colombia. *Rev ICA.* 19: 413-416.
- Ghosh D, Misra KK. (2011). Major lipids and fatty acids in the liver and rumen of the goat (*Capra hircus*) infected with the trematode *Paramphistomum cervi*. *J Helminthol.* 85: 246-254.

- Giraldo-Pinzón EJ, Pinto HA, Castañeda PA. (2011). Prevalencia de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) a partir de los registros de decomiso de hígados bovinos en la central de sacrificio de Manizales. 2007 al 2009. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Gordon DK, Roberts LC, Lean N, Zadoks RN, Sargison ND, Skuce PJ. (2013). Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Vet Parasitol.* 195: 65-71.
- Griffiths IB, Parra DG, Vizcaíno OG, Gallego MI. (1986). Prevalence of parasite eggs and cysts in faeces from dairy cows in Colombia. *Trop Anim Health Prod.* 18: 155-157.
- Hanif F, Kumar P, Singh DK. (2013). Behavioural responses of *Lymnaea acuminata* against apigenin, morusin and quercetin in bait pellets. *Sci J Zool.* 2: 40-45.
- Henderson I, Triebkorn R. (2002). Chemical Control of Terrestrial Gastropods. En: *Molluscs as Crop Pests* (ed. G.M. Barker). CAB International, pp 1-31.
- Hernández JA, Arroyo Balán FL, Bonilla Quintero R, Sanchez-Andrade Fernandez R, Arias Vázquez MS. (2015b). Control biológico de parásitos en la ganadería. Hongos del suelo. *Rev Zoociencia* 2: 3-11.
- Hernández JÁ, Arroyo F, Francisco R, Bonilla R, Cazapal-Monteiro C, Francisco I, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2015c). Prevention of infection by strongyles in grazing cattle. Biological control with feedstuff added *Duddingtonia flagrans* spores. The Congress on Controversies & Consensus in Bovine health, Industry & Economics (CoBo), Berlín (Alemania), 27-30 agosto.
- Hernández JA, Bonilla R, Arias MS, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2015a). Repercusiones económicas de los trematodos en el ganado bovino. X Latin American Veterinary Conference, Lima (Perú), 21-24 abril.
- Hutchinson GW, Dawson K, Fitzgibbon CC, Martin PJ. (2009). Efficacy of an injectable combination anthelmintic (nitroxynil + clorsulon + ivermectin) against early immature *Fasciola hepatica* compared to triclabendazole combination flukicides given orally or topically to cattle. *Vet Parasitol.* 162: 278-284.
- Iannacone J, Pérez D. (2008). Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae). *Rev Bras Toxicol.* 21: 33-43.
- Ibarra-Moreno S, Ibarra-Velarde F, Ávila-Acevedo JG. (2012). *In vitro* evaluation of fasciolicide Activity with hexane, methanol and ethyl acetate with extracts processed and obtained from some mexican plants used in traditional medicine based on ethno botanical studies. *AJPS* 3.

- ICA (2015). Tabla de población bovina por municipio y por departamento, 2015. Instituto Colombiano Agropecuario. <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2008.aspx>
- Jaiswal P, Singh DK. (2009). Molluscicidal activity of nutmeg and mace (*Myristica fragrans* houtt.) against the vector snail *Lymnaea acuminata*. J Herbs Spices Med Plants. 15: 177-186.
- Khedri J, Radfar MH, Borji H, Mirzaei M. (2015). Prevalence and intensity of *Paramphistomum* spp. in cattle from south-eastern Iran. Iran J Parasitol. 10: 268-272.
- Longo M, Zamora H, Vásquez R, Velásquez LE. (2005). Aspectos ecológicos de *Lymnaea* (Lymnaeidae) en la región de Aguas Tíbias, municipio de Puracé-Coconuco. Rev Asoc Col Ciencias Biol. 17: 47-58.
- López L, Romero J, Velásquez L. (2008). Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja del trópico alto en el occidente de Colombia. Rev Col Ciencias Pec. 21: 9-18.
- López Martínez J, Velásquez Trujillo LE. (2012). *Cotylophoron panamensis* (Digenea: Paramphistomidae) en bovinos del Meta y del Guaviare, Colombia. Acta Bio Col. 17: 2.
- Lýsek H, Krajčí D. (1987). Penetration of oicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg - shells. Folia Parasitol. 34: 57-60.
- Lýsek H, Štěrbá J. (1991). Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Folia Parasitol. 38: 255-259.
- Maciel AS, Freitas LG, Figueiredo LD, Campos AK, Mello IN. (2012). Antagonistic activity of the fungus *Pochonia chlamydsoria* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. Parasitology. 139: 1074-1085.
- Mage C, Reynal PH. (1990). Lês paramphistomidés Essai d'activité de quelques anthelminthiques. GTV 4B. 356: 9-11.
- Mage C, Bourgne H, Toullieu JM, Rondelaud D, Dreyfuss G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. Vet Res. 33: 439-447.
- Malrait K, Verschave S, Skuce P, Van Loo H, Vercruyse J, Charlier J. (2015). Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) in cattle. Vet Parasitol. 207: 134-139.
- Marston A, Hostettman K. (1985) Plant molluscicides. Phytochemistry 24: 639-652.
- Martínez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Gallego J, Ariza F. (2005). Evaluación genética para resistencia a brucelosis en ganado criollo colombiano bon. Arch Zootec. 54: 333-340.

- Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Benavides J, Morán L, Andrés S, Giráldez FJ, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M. (2014). Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci*. 97: 71-79.
- Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Castañón-Ordóñez L, Famularo MR, Fernández-Pato N, Rojo-Vázquez FA. (2010). Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet Parasitol*. 174: 166-169.
- Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez FA. (2014). Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Exp Parasitol*. 136: 59-62.
- Mavenyengwa M, Mukaratirwa S, Monrad J. (2010). Influence of *Calicophoron microbothrium* amphistomosis on the biochemical and blood cell counts of cattle. *J. Helminthol.*, 84: 355-361.
- Mavenyengwa M, Mukaratirwa S, Obwolo M, Monrad J. (2005). A macro- and light microscopical study of the pathology of *Calicophoron microbothrium* infection in experimentally infected cattle. *Onderstepoort J Vet Res*. 72: 321-332.
- Mendoza de Gives P, Flores Crespo J, Herrera Rodriguez D, Vazquez Prats V, Liebano Hernandez E, Ontiveros Fernandez GE. (1998). Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *J Helminthol*. 72: 343-347.
- Mezo M, González-Warleta M, Ubeira FM. (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J Parasitol*. 93: 65-72.
- Miranda M, Costa H. (1999). Report and redescription of some species of *Cotylophoron* (Trematoda: Paramphistomidae) in domestic ruminants of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 8: 1-15.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrociencias Colombia. (2005). Documento de Trabajo No. 74.
- Mooney, Good B, Hanrahan JP, Mulcahy G, de Waal T. (2009). The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Vet Parasitol*. 164: 201-205.
- Murphy TM, Power EP, Sanchez-Miguel C, Casey MJ, Toolan DP, Fagan JG. (2008). Paramphistomosis in Irish cattle. *Vet Rec*. 162: 831.
- Naples JM, Shiff C, Halden RU. (2005). Reduction of infectivity of schistosome cercariae by application of cercaricidal oil to water. *Am J Trop Med Hyg*. 73: 956-961.
- O'Brien B, Jordan K, Danaher M. (2010). Update on the use of flukicides. *Irish Vet J*. 63: 702-704.

- Olaechea F. (2004). *Fasciola hepatica*. Comunicación Técnica N°449 Área: Producción Animal. http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/81-hidatidosis.pdf
- Oliver Rullán AJ. (2014). Diagnóstico de ciatostominosis mediante antígenos purificados por cromatografía FPLC. Memoria de Licenciatura. Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, España.
- Orozco LC, Ovalle CE, Duque S, López MC, Nicholls RS. (1996). Exactitud del ELISA para el diagnóstico de fascioliasis bovina: análisis del área bajo la curva del receptor operador (ROC). *Biomédica*. 16: 122-131.
- Pantelouris EM. (1965). The common liver fluke *Fasciola hepatica*. Oxford: L. Pergamon Press.
- Paraud C, Gaudin C, Pors I, Chartier C. (2009). Efficacy of oxclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. *Vet J*. 180: 265-267.
- Parra D, Gallego MI, Griffiths IB. (1982). Prevalencia de la paramfistomiasis bovina en hatos lecheros de Colombia. *Rev Col Cienc Pec*. 33-34.
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Rodríguez-Medina JR, Arias M, Morrondo P, Díez-Baños P. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol Res*. 95: 129-135.
- Paz-Silva A, Arias M, Francisco I, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R. (2010). Cross-immunity and interpretation of the diagnostics of parasitic trematodosis in ruminants by means of immunoenzymatic probes. En: La Mann G (Editor), *Veterinary Parasitology*. Novapublishers (USA): 302-317.
- Paz-Silva A. (2015). Control biológico de las enfermedades parasitarias en animales de producción. Control parasitológico integrado en animales. Curso organizado por el Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears. Palma de Mallorca, 26-27 de marzo.
- Pfukenyi DM, Mukaratirwa S, Willingham AL, Monrad J. (2005). Epidemiological studies of amphistome infections in cattle in the highveld and lowveld communal grazing areas of Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet Res*. 72: 67-86.
- Piñeiro P, Sanchís J, Miguélez S, Rodríguez MI, Suárez JL, Cazapal-Monteiro C, Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade R. (2012). Control of trematode infection can be improved by means of soil fungi. XXVII Congresso de la Società Italiana di Parasitologia (SOIPA). *Mappe Parasitologiche*, 18: 85.
- Piñeiro Fraga P. (2013). Estudio de los posibles reservorios de la fasciolosis en Galicia. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, España.

- Pulido A, Castañeda R, Arbelaez G. (2011). *Fasciola hepatica*: Pedagogía de diagnóstico por laboratorio y su situación en Colombia. Revista Electrónica de Veterinaria 12: 92-101. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511B/051124.pdf>
- Rangel-Ruiz LJ, Albores-Brahms ST, Gamboa-Aguilar J. (2003). Seasonal trends of *Paramphistomum cervi* in Tabasco, México. Vet Parasitol. 116: 217-222.
- Rodríguez DC, Pino N, Peñuela G. (2012). Microbiological quality indicators in waters of dairy farms: detection of pathogens by PCR in real time. Sci Total Environ. 427-428: 314-318.
- Rodríguez H. (1984). Determinación de un huésped intermediario de la paramphistomiasis bovina en condiciones de piedemonte llanero. Trabajo de Grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Tecnológica de los Llanos Orientales, Villavicencio, Colombia.
- Rodríguez-Pérez J, Hillyer GV. (1995). Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *F. hepatica*. Vet Parasitol. 56: 57-66.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M. (2012). Update on trematode infections in sheep. Vet Parasitol. 189: 15-38.
- Roldán D, Tejada, M, Salazar M. (2003). La cadena láctea en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo No. 4. Bogotá. 19 p. www.agrocadenas.gov.co
- Rolfe PF, Boray JC. (1987). Chemotherapy of paramphistomosis in cattle. Aust Vet J. 64: 328-332.
- Rug M, Ruppei A. (2000). Toxic activities of the plant *Jathropa curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. Trop Med Int Health 5: 423-430.
- Sagüés MF, Purslow P, Fernández S, Fusé L, Iglesias L, Saumell C. (2011). Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes. Rev Iberoam Micol. 28: 143-147.
- Sanabria REF, Romero JR. (2008). Update on paramphistomosis. Helminthologia 45: 64.
- Sanabria R, Moreno L, Alvarez L, Lanusse C, Romero J. (2014). Efficacy of oxclozanide against adult *Paramphistomum leydeni* in naturally infected sheep. Vet Parasitol. 206: 277-281.
- Sanchís J, Miguélez S, Macchi MI, Maldini G, Piñeiro P, Venzal J, Díez-Baños P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS. (2011). Estudio epidemiológico transversal de la fasciolosis en ganado vacuno del Uruguay. AIDA: 768-770.
- Sanchís J, Sánchez-Andrade R, Macchi Mi, Piñeiro P, Suárez JL, Cazapal-Monteiro C, Maldini G, Venzal JM, Paz-Silva A, Arias MS. (2013). Infection by Paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain. Vet Parasitol. 191: 165-171.

- Sanchís J. (2015). Epidemiología de las trematodosis bovinas en la región de Salto (Uruguay). Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, España.
- Santarém V, Tostes R, Alberti H, Sanches O. (2006). *Fasciola hepatica* en Capybara. Acta Trop. 98: 311-313.
- Saumell CA, Fernández AS, Echevarria F, Gonçalves I, Iglesias L, Sagües MF, Rodríguez EM. (2015). Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. J Helminthol. 1: 1-6.
- Shokier KM, Aboelhadid SM, Waleed MA. (2013). Efficacy of five anthelmintics against a natural *Fasciola* species infection in cattle. Beni-Suef Univ J Basic App Sci. 2: 41-45
- Silvestre A, Sauvé C, Cabaret J. (2000). Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. Vet Rec. 146: 674-675.
- Sivajothi S, Reddy BS. (2014). Immature paramphistomosis in a sheep herd. IJBR 2: 140-142.
- Spithill TW, Piedrafita D, Smooker PM. (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. Int J Parasitol. 27: 1221-1235.
- Stear MJ, Doligalska M, Donskow-Schmelter K. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. Parasitology. 134: 139-151.
- Stirling GR, McKenry M, Mankau R. (1979). Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peach. Phytopathology. 69: 806-809.
- Suárez JL, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Romasanta A, Miguélez S, Sanchís J, Francisco R, Bonilla R, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2013). Tratamiento de la parafistomosis bovina. AIDA: 786-788.
- Szmid-Adjidé V, Abrous M, Adjidé CC, Dreyfuss G, Lecompte A, Cabaret J, Rondelaud D. (2000). Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. Vet Parasitol. 87: 133-138.
- Thrusfield M. (2005). Veterinary Epidemiology. Blackwell Science Limited, USA.
- Titi A, Mekroud A, Chibat MH, Boucheikhchoukh M, Zein-Eddine R, Djuikwo-Teukeng FF, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G. (2014). Ruminal paramphistomosis in cattle from northeastern Algeria: prevalence, parasite burdens and species identification. Parasite 21: 50. doi: 10.1051/parasite/2014041.
- Torrel TS, Paz A. (2015). Paramphistomosis en bovinos y ovinos en Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.

- Vera-Montenegro Y, Ibarra-Velarde F, Ramírez-Ávila G, Munguía-Xochihua J. (2009). *In vitro* fasciolicide activity of some plant extracts against newly excysted flukes. Ann NY Acad Sci. 1149: 180-182.
- Vinaud MC, Santos SC, Ferri PH, Souza LR JR, Barreto BJC. (2005). Avaliação da actividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do género *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercarias de *Schistosoma mansoni*. Rev Patol Trop. 34: 137-143
- Waller PJ. (2006). From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. Vet Parasitol. 139: 1-14.
- Wilches C, Jaramillo J, Muñoz D, Robledo S, Vélez I. (2009). Presencia de infestación por *Fasciola hepatica* en habitantes del valle de San Nicolás, oriente antioqueño. Asoc Col Infect - Rev infect. 13: 2.
- Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruysse J. (1995). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). Vet Parasitol. 58: 181-213.

