



Universidad Nacional Del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinarias
Corrientes-Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-
OPCIÓN CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES

Título: Diagnóstico de trematodes encontrados en rumen de bubalinos del noroeste de la provincia de Corrientes.

Tutor externo: MV. Meana Colodrero, Maria Elina.

Tutor interno: Dra. Martínez, Emilia Irina.

Residente: Argoitia, Rita Lucila

e-mail: ritaargoitia@gmail.com

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
Clasificación taxonómica (Sey, 1991):	5
OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos particulares	7
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Materiales:	7
Ámbito de estudio:	7
Unidad de análisis:	7
Métodos:	8
Microscopia Estereoscópica:	8
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB):	8
Microscopía Óptica-Histología:	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
CONCLUSIÓN	20
BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXO 1	234

RESUMEN

La paramfistomosis es una parasitosis ocasionada por trematodos pertenecientes a la familia *Paramphistomidae*, localizados principalmente en el rumen y retículo de rumiantes, los bovinos y búfalos son los hospedadores definitivos más importantes, seguidos de ovejas y cabras. Está ampliamente distribuido tanto en regiones tropicales, subtropicales y templadas en donde las condiciones de humedad y la presencia del hospedador intermediario adecuado permiten que su ciclo evolutivo se desarrolle completamente. En este trabajo se presenta el hallazgo de trematodos en el retículo-rumen de dos búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) pertenecientes al rodeo general del establecimiento “Paso Laurel”, en la localidad de Paso Florentín del departamento de General Paz, Corrientes, Argentina, con el propósito de clasificar el género y si es factible especie de los parásitos. Se realizaron observaciones del aspecto general con lupa estereoscópica, para luego clasificarlos en dos grupos, los que presentaban bolsa de Cirro y los que no, (Grupo 1 y Grupo 2). Mediante microscopía electrónica de barrido, se identificaron estructuras propias del género de los trematodos y por cortes histológicos se pudieron observar estructuras internas, que permitieron orientar la identificación de los anfstomas. Se llegó a la conclusión de que se trataba de una infestación conjunta en ambas búfalas, con la presencia de los trematodos clasificados como *Paramphistomum* sp. y *Balanorchis anastrophus*. A partir de estudios morfológicos e histológicos que se pudieron obtener, nos permite generar una nueva fuente de información sobre estos parásitos presentes en búfalos de nuestra región, que afectan de manera directa al sector ganadero.

INTRODUCCIÓN

Algunas especies domésticas y el hombre, son susceptibles a padecer infestaciones producidas por parásitos trematodes. Dentro de las más frecuentes y de distribución mundial emergente se nombra a la fasciolosis y paramphistomosis. Se conoce genéricamente como paramphistomosis a la parasitosis producida en rumiantes por trematodes pertenecientes, en su mayoría, a la familia *Paramphistomidae*, pudiendo hallarse otras familias involucradas (*Gastrothylacidae* y *Balanorchiidae*) de acuerdo a la distribución geográfica. Como en los demás digeneos, el ciclo vital requiere de un molusco gasterópodo como hospedador intermediario. Estos parásitos, en sus estadios inmaduros se ubican en el intestino delgado proximal y migran en forma anterógrada, alcanzando finalmente el rumen, donde permanecen como adultos. La paramphistomosis ha sido descrita en hábitats de tierras bajas y frecuentemente inundadas, alrededor de lagos y lagunas (Sanabria y Romero, 2008). Los bovinos y búfalos son los hospedadores definitivos (HD) más importantes, seguidos de ovejas y cabras (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Originalmente se pensaba que la enfermedad se limitaba a los trópicos y subtrópicos (Taylor *et al.*, 2007), pero estudios recientes lo han detectado en regiones templadas (Nikander y Saari, 2007).

Los rumiantes se infectan por vía oral al ingerir las formas infectivas, denominadas metacercarias, que al llegar al abomaso se desenquistan para liberar los parásitos jóvenes que migran hacia el intestino delgado y posteriormente al rumen, donde alcanzan la madurez sexual e inician la liberación de huevos (Soulsby, 1987).

La paramphistomosis tiende a desarrollar dos tipos de infestación en el tracto digestivo del animal: la intestinal, provocada por trematodos inmaduros migratorios, y la ruminal producida por trematodos maduros (Dirksen *et al.*, 2005).

El cuadro clínico se presenta sólo cuando hay gran cantidad de formas inmaduras y se manifiesta como un síndrome de mala digestión que en casos extremos produce anorexia y muerte. Los daños causados a los rumiantes provocan desnutrición, pérdida de peso, decrecimiento en la producción de leche y disminución en la capacidad reproductiva, lo que se traduce en pérdidas cuantiosas para la economía del renglón ganadero (Muro y Ramajo, 2002).

En casos graves pueden desarrollar anemia, hipoproteinemia, edemas y emaciación. Por el contrario, los trematodos adultos fijados a la mucosa del rumen originan trastornos clínicos menores que las fases juveniles migrantes (Borchert, 1981).

Diversos reportes indican que existe mayor susceptibilidad en animales jóvenes que llegan a albergar un mayor número de parásitos, a diferencia de los adultos donde se observa cierto grado de inmunidad, convirtiéndose en reservorios importantes de la infestación para los caracoles (Urquhart *et al.*, 2001, Radostits *et al.*, 2002; Dirksen *et al.*, 2005).

El diagnóstico por métodos inmunológicos y serológicos para la detección de anticuerpos no son concluyentes (Singh *et al.*, 1983; Rieu *et al.*, 2007). Por consiguiente, de forma rutinaria de la paramphistomosis en animales vivos todavía depende la observación de huevos en el examen fecal; sin embargo, infestaciones de baja intensidad pueden pasar desapercibidas, y se debe esperar la madurez sexual de los parásitos para poder observar los huevos en las heces (Rieu *et al.*, 2007).

La observación de ejemplares adultos en necropsias o hallazgos en frigoríficos son útiles para la determinación taxonómica. Muchas especies de Paramphistomidos se describieron inicialmente basándose únicamente en la morfología, principalmente la del acetábulo, la faringe, los genitales terminales, las papilas tegumentarias y los órganos internos. Sin embargo, el hecho de que los trematodos tienen cuerpos gruesos y robustos, y que la mayoría de los especímenes del tracto gastrointestinal sean sexualmente inmaduros hace que la identificación morfológica sea menos confiable. Como resultado, es probable que algunas de las especies previamente identificadas sean sinónimas (Eduardo, 1983).

Morfológicamente se los distingue por su cuerpo piriforme, color rosado cuando están vivos, poseen una ventosa oral y una ventosa prominente en posición terminal o ventro terminal denominada acetábulo, mediante la cual se fijan a la mucosa. Una ventosa o poro genital de desarrollo variable que según el género se presenta en la superficie cóncava del cuerpo (Sanabria, 2011).

Es muy difícil identificar y diferenciar las especies de anfishomas sobre la base de su morfología debido a la variación significativamente menor en el tamaño y la forma del parásito y sus órganos internos, que varía incluso en gusanos maduros e inmaduros de la misma especie. La morfología no puede apreciarse muy bien en el microscopio estereoscópico, pero puede confirmarse bien mediante el examen histológico del parásito (Chaoudhary *et al.*, 2015).

Son varios los géneros involucrados, no obstante la dispersión mundial de éstos es bastante irregular y la complejidad de la sistemática morfológica de estas entidades induce a frecuentes errores en su clasificación. A pesar de los sucesivos cambios de ordenamiento sistemático que presentan estas entidades, el nivel taxonómico de Familia es el que ha permanecido más estable (Over *et al.*, 1992).

La clasificación está basada en la ponderación de criterios holomorfológicos para los amphistomas en general, enmarcando en ésta, a los parásitos de mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios. En lo que respecta al interés veterinario, se puede resumir que dicha clasificación ordena a la Superfamilia *Paramphistomoidea* en varias familias, de las cuales las que involucran a parásitos de los rumiantes son *Gastrothylacidae* y *Paramphistomidae*. La última contiene dos subfamilias: *Orthocoeliinae* y *Paramphistominae*, y a su vez esta última es continente de los géneros parásitos de rumiantes. Los miembros de la Familia *Gastrothylacidae* se hallan fundamentalmente en Asia y África, así como los géneros como *Ugandocotyle sp.*, *Gigantocotyle sp.* y en parte *Cotylophoron sp.*, originados principalmente en el último continente mencionado. Paralelamente, se encuentra la superfamilia *Cladorchoidea* que contiene, entre otras, a la Familia *Balanorchiidae*, cuyo único integrante es *Balanorchis anastrophus*, parásito de rumiantes de América del Sur. Este es fácilmente distinguible del resto de los paramphistomidos por poseer tres filas de papilas en la extremidad anterior y un anillo muscular ventral por donde protruye la bolsa del cirro, lo cual ha dado origen al nombre del género (Sey, 1991).

Clasificación taxonómica (Sey, 1991):

Los géneros más importantes en referencia a la Paramphistomosis de los rumiantes serían:

Reino: *Metazoa*

Phylum: *Platyhelminthes*

Clase: *Trematoda*

Subclase: *Digenea*

Orden: *Echinostomida*

Suborden: *Paramphistomata*

Superfamilia: *Cladorchioidea*

Familia: *Balanorchidae*:

Género/especie:

-*Balanorchis anastrophus*

Superfamilia: *Paramphistomoidea*

Familia: *Gastrothylacidae*:

Género:

-*Carmyerius* sp.

-*Fischoederius* sp.

-*Gastrothylax* sp.

-*Velazquezotrema* sp.

Familia: *Paramphistomidae*:

Subfamilia: *Paramphistominae*:

Género:

-*Calicophoron*

-*Cotylophoron*

-*Explanatum*

-*Gigantocotyle*

-*Paramphistomum*

-*Ugandocotyle*

El género *Paramphistomum* parece ser el de mayor dispersión mundial, no obstante, dada la complejidad de la sistemática es frecuente que se realicen determinaciones específicas equívocas e incluso genéricas, por cuanto los mapas de distribución, basados en reportes previos, no están exentos de potenciales errores. La biología molecular ofrece hoy una herramienta complementaria y robusta que permite resolver algunas de estas cuestiones (Over *et al.*, 1992).

Dada la gran similitud entre especies dentro de la familia *Paramphistomidae*, y su compleja sistemática, las técnicas de biología molecular podrían aportar nuevos elementos de juicio para la diferenciación y caracterización de especies. Algunos géneros han sido estudiados mediante técnicas moleculares, Itagaki *et al.* (2003) caracterizaron tres géneros diferentes mediante el espacio interno transcrita 2 (ITS-2) del DNA ribosómico (rDNA), mientras que Rinaldi *et al.* (2005) aplicaron técnicas similares usando el ITS-2 de *Calicophoron daubneyi* obtenidos de diferentes HD (Sanabria, 2011).

La paramfistomosis es una enfermedad poco descrita en el NEA, se notificó por primera vez el hallazgo de especímenes de la Familia *Paramphistomidae* en bovinos procedentes de los departamentos de Mercedes y Goya, que fueron al “Frigorífico de Corrientes” (San Cayetano, 27°25'S, 58°39'W, Pcia. de Corrientes) clasificándolos como *Cotylophorum cotylophorum* (Racioppi, 1994), pero años más tarde, se realizó una revisión de este hallazgo, donde se examinaron los ejemplares y se compararon con otros ejemplares procedentes de la provincia de Buenos Aires, y con métodos más modernos de identificación, se pudo determinar que eran, en realidad, *Paramphistomum leydeni* (Sanabria *et al.*, 2009).

A la fecha, no se cuenta con información confiable del grado de parasitismo en los animales de esta región, ya que es una enfermedad comúnmente subdiagnosticada y que inclusive puede ser fácilmente confundida con fasciolosis. El desarrollo de este trabajo de investigación puede aportar nuevos conocimientos acerca de esta enfermedad en la especie bubalina y así poder facilitar la solución a futuras problemáticas del sector.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Clasificar trematodos recolectados en bubalinos del Departamento de General Paz, Corrientes, Argentina.

Objetivos particulares

- Obtener ejemplares para su posterior estudio por medio de técnicas macroscópicas y microscópicas.
- Identificar macroscópicamente con el fin de evaluar su localización y aspectos morfológicos en fresco, durante la necropsia, a partir de la inspección.
- Identificar microscópicamente las estructuras externas con el fin de especificar la morfología, realizar mediciones y tomar registros, utilizando microscopia estereoscópica y microscopia electrónica de barrido.
- Identificar las estructuras internas a fin de detallar los órganos presentes en los parásitos mediante técnicas histológicas.
- Determinar el género y si es factible de la especie encontrada con el propósito de revelar el hallazgo de los parásitos encontrados en las búfalas por medio de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

- Ámbito de estudio:

-Establecimiento “Paso Laurel”, Ruta 5 km 110, en la Localidad de Paso Florentín (-27.747194, -57.748952), Departamento de General Paz, de la Provincia de Corrientes, República Argentina.

-Laboratorio de la Cátedra de Enfermedades Parasitarias-UNNE.

-Laboratorio de parasitología del centro de diagnóstico e investigación veterinaria (CEDIVE) de la UNLP.

- Unidad de análisis:

Dos búfalas (*Bubalus bubalis*) pertenecientes al rodeo general del establecimiento. Ambas, mayores a los 5 años de edad y de Raza Mediterránea que fueron enviadas a faena.

Posterior a la faena de los animales y tras la inspección del rumen, se detectaron estructuras parasitarias que fueron recogidas cuidadosamente con la ayuda de pinzas de disección en la mucosa del retículo y rumen de las búfalas afectadas. También se obtuvo un recorte de la pared del rumen.

Posteriormente, se procedió a almacenar las muestras clasificándolas de acuerdo al tamaño de los ejemplares en diferentes frascos de plástico, se colocaron con formol al 10% y otros fueron conservados en alcohol al 96%. Las muestras fueron rotuladas, obteniendo un total de 10 frascos, 8 de ellos con ejemplares en formol y 2 frascos con alcohol. (Ver ANEXO 1)

Métodos:

- Microscopía Estereoscópica:

Se realizó la observación de diferentes ejemplares que fueron colocados en Cajas de Petri para facilitar su revisión, con un Microscopio estereoscópico OLYMPUS Sz4045 Head SZ40, en diferentes aumentos y realizando mediciones milimetradas, llevando anotaciones y registros fotográficos de los parásitos.

- Microscopía Electrónica de Barrido (MEB):

Se realizó observación y análisis de un número de ejemplares representantes de las muestras obtenidas de las búfalas, identificados como 1, 2, 3 y 4 MEB, según sus características más relevantes. La técnica se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) que se encuentra en la Facultad de Ciencias Agrarias, el servicio nos brindó un turno de 2 horas de observación en el MEB marca JEOL 5800 LV, incluyendo grabación de imágenes digitalizadas, los especímenes fueron lavados en solución fisiológica, luego transferidos en alcohol al 70% y sometidos a ultrasonido, fueron deshidratados en alcohol etílico al 80%, 90%, 100% y 100% durante 15 minutos en cada concentración y luego secado de las muestras a punto crítico, se colocaron en un soporte de aluminio y se realizó el sputtering (metalizado) con oro, oro paladio a cargo del personal técnico encargado en este caso la Lic. Ma. Cecilia Galíndez. Se tomaron registros fotográficos del cuerpo, la ventosa oral, poro genital y acetábulo, para observar las características y tomar mediciones.

- Microscopía Óptica-Histología:

Se tomaron 3 ejemplares característicos (1, 2 y 3 MOH) y se colocaron cuidadosamente en celdillas histológicas, se fijaron con etanol 70 %, luego de la deshidratación, fueron incluidos en parafina y cortados con micrótopo en secciones longitudinales y sagitales de 4 – 5 µm de espesor, siguiendo técnicas histológicas estándar. Las secciones separadas se colorearon con hematoxilina – eosina (H-O). Se

llevó a cabo en el Servicio de Histopatología y Citología de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) en la Facultad de Ciencias Veterinarias, a cargo de todo el proceso la Dra. Rosa Insfran. Se examinaron con un Microscopio Binocular ARCANO XSP-100, en búsqueda de las estructuras musculares de importancia para la clasificación taxonómica como ser: acetábulo, faringe y genitalia (ovario y testículos) de las cuales se tomaron fotografías.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el establecimiento “Paso Laurel”, las búfalas son criadas en los potreros con bañados y lagunas, ya que es el hábitat donde se desarrollan con mayor confort y productividad (Imagen N°1).



Imagen N° 1: *Establecimiento “Paso Laurel”, con características propicias para el desarrollo del ciclo de los trematodos.*

Las dos búfalas fueron enviadas a faena (Imagen N° 2), durante la misma, se pudo examinar la mucosa del rumen y redecilla donde se observaron los ejemplares de trematodos adheridos y agrupados en colonias en forma de “racimos”, situados en las paredes del retículo y entre las papilas del rumen (Imagen N° 3)



Imagen N° 2: *Unidad de análisis.*



Imagen N°3: *ejemplares adheridos al epitelio y a las papilas ruminales.*

Se recolectaron más de 300 ejemplares y se tomó una muestra de las papilas ruminales. Observando que existen diferencias en formas y tamaños entre ellos. Se apreció el color de los parásitos frescos, los cuales presentaban un color rosado. Estos fueron conservados y almacenados según protocolos ya estandarizados de la necropsia dirigida a trematodos (ANEXO 1).

Quiroz Romero (1984), expresa que los Paramphistomidos adultos se suelen encontrar adheridos al epitelio del rumen, y que provocan palidez en las papilas

ruminales, también destaca que la presencia de estos parásitos puede ocasionar zonas de necrosis debido a la presión provocada por el acetábulo del trematodo al estar fijado en la base de las papilas, las cuales se encuentran generalmente atrofiadas, y además cuando se desprenden, quedan unos botones prominentes en la mucosa (Imagen N°4), que marca el sitio en donde estaban fijados, tal como pudimos apreciar en la muestra de



epitelio que recolectamos.

Imagen N°4: *Observación de parásitos adheridos al epitelio ruminal, el cual se encontró alterado.*

En el Laboratorio de la Cátedra de Parasitología se observaron bajo lupa estereoscópica binocular, para comenzar con su clasificación. Algunos presentaban formas piriformes y otros una forma cónica. La cara ventral algo cóncava y cara dorsal convexa, cuerpo arqueado, y la parte anterior, más estrecha que la posterior (Imagen N° 5). Además presentaban una particularidad diferencial entre sí, y se decidió agruparlos según ello en dos grupos: los que presentaban bolsa de cirro protruyendo (Grupo 1) y los que no presentaban bolsa de cirro protruyendo (Grupo 2).



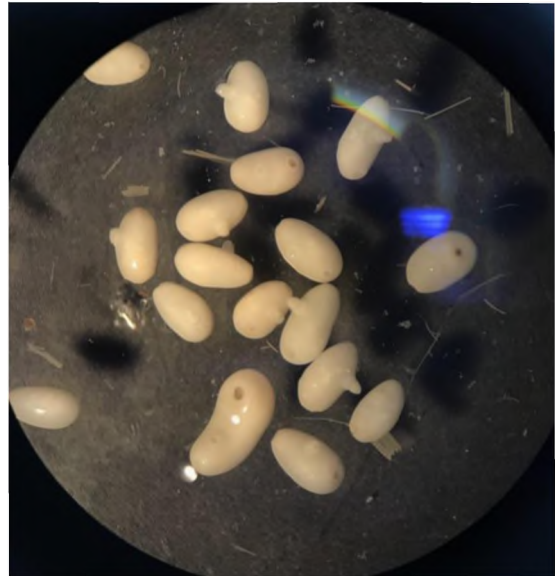
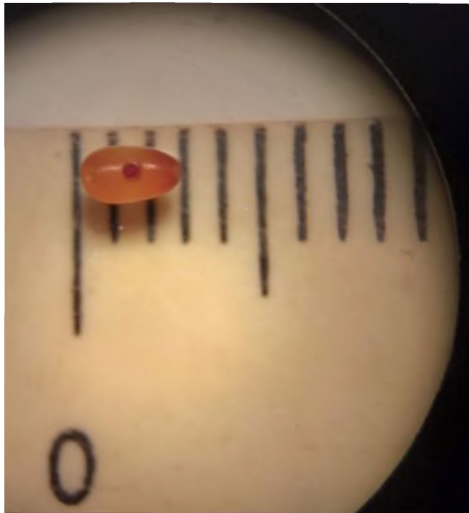


Imagen N° 5: *Morfología de los trematodos, bajo lupa estereoscópica.*

En estado fresco se observó que presentaban un color rosado claro con mayor o menor intensidad en algunas zonas de su cuerpo y realizamos mediciones con una regla



milimetrada obteniéndose en promedio medidas que van desde los 3 a 8 milímetros de longitud (Imagen N° 6) y 1 a 3 milímetros de ancho, en nuestros ejemplares.

Imagen N° 6: *Mediciones milimetradas de los parásitos.*

Pudimos distinguir estructuras tales como: ventosa oral en su porción anterior, poro genital en la porción posterior de su cuerpo y acetábulo. (Imagen N° 7).

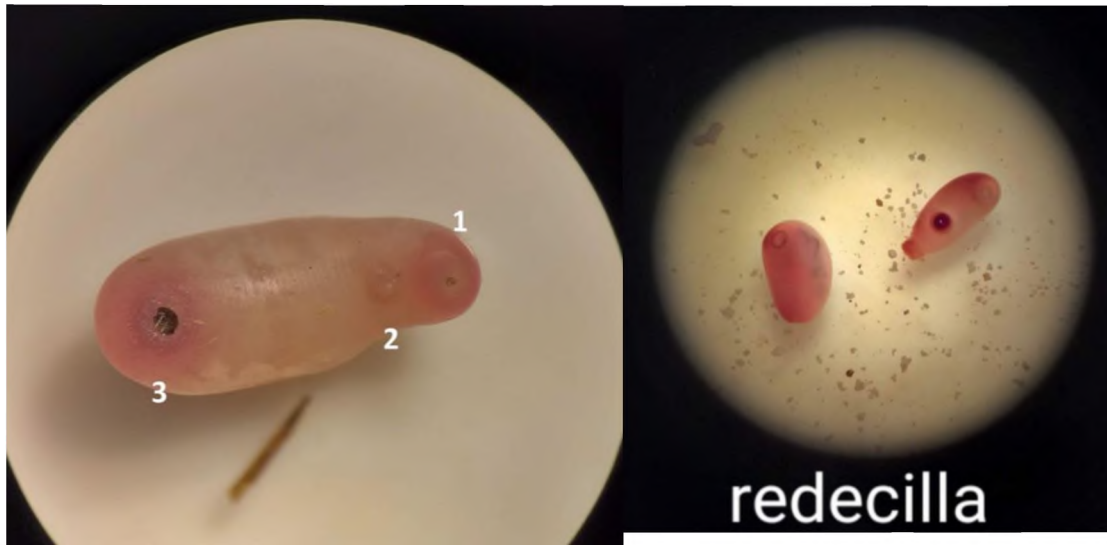


Imagen N° 7: Trematodos presentes en el rumen y redecilla, donde se pueden observar el color, la forma y algunas estructuras.. Referencias: 1-Ventosa oral; 2-Poro genital y 3-Acetábulo.

Con las imágenes obtenidas por MEB se pudieron distinguir con una mayor precisión las estructuras morfológicas. El ejemplar 1MEB, presentó el cuerpo algo piriforme, ligeramente cónico, de 7 x 1,5 mm (Imagen N°8c). La ventosa oral con tegumento grueso y presencia de pequeñas papilas (Imagen N° 8b), acetábulo y poro genital con presencia de bolsa del cirro protruida (Imagen N°8a), Clasificándose en el Grupo N°1.

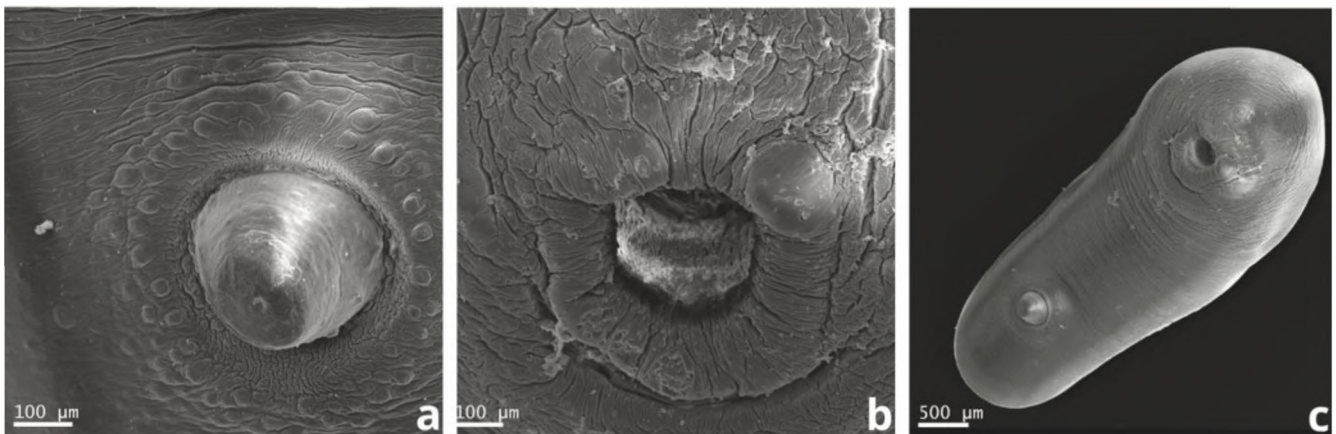


Imagen N° 8: Trematodo 1MEB: (a) Poro genital con presencia de bolsa de cirro protruida (barra de escala: 100 µm). (b) Acetábulo (barra de escala: 100 µm). (c) Parásito entero (barra de escala: 500 µm).

El Ejemplar 2MEB, presenta el cuerpo pequeño, cónico, casi redondo, de 3 mm de largo x 1,2 mm de ancho (Imagen N°9d). En el extremo anterior alrededor de la abertura oral presenta papilas tegumentarias (Imagen N°9a), que son estructuras largas digitiformes de 30-60 µm, en las cuales hay estructuras más pequeñas emanando como pequeñísimas ramas laterales que miden de 4 a 6 µm de largo, cada una con un cilio en su punta. El mismo tipo de pequeñas estructuras ciliadas también se encuentran en las

superficies entre y alrededor de las papilas largas (Imagen N°9b), estas estructuras tienen una función sensorial. El acetábulo subterminal o casi terminal, en dirección dorso-ventral. Presenta bolsa de Cirro protruida con la característica de poseer alrededor un anillo muscular que la recubre (Imagen N°9c). Por dicha característica también lo incluimos en el Grupo 1.



Imagen N° 9: *Trematodo 2MEB:* (a) Acetábulo (barra de escala: 50 μ m). (b) Extremo anterior donde se observan largas papilas alrededor de la abertura oral (barra de escala: 50 μ m). (c) Región del poro genital con bolsa de cirro protruida (barra de escala: 100 μ m). (d) Parásito entero, vista ventral-lateral (barra de escala: 200 μ m)

A diferencia del grupo anterior, los ejemplares del Grupo 2, no presentan bolsa de Cirro (Imagen N°10c) como es el caso del ejemplar 3MEB. Cuyo tamaño es de 7 x 2 mm. En el extremo anterior se encontró la abertura oral, la cual a su alrededor presentaba papilas (Imagen N°10a), presenta una prominencia en su superficie dorsal que llama la atención y fue el único ejemplar con la misma.

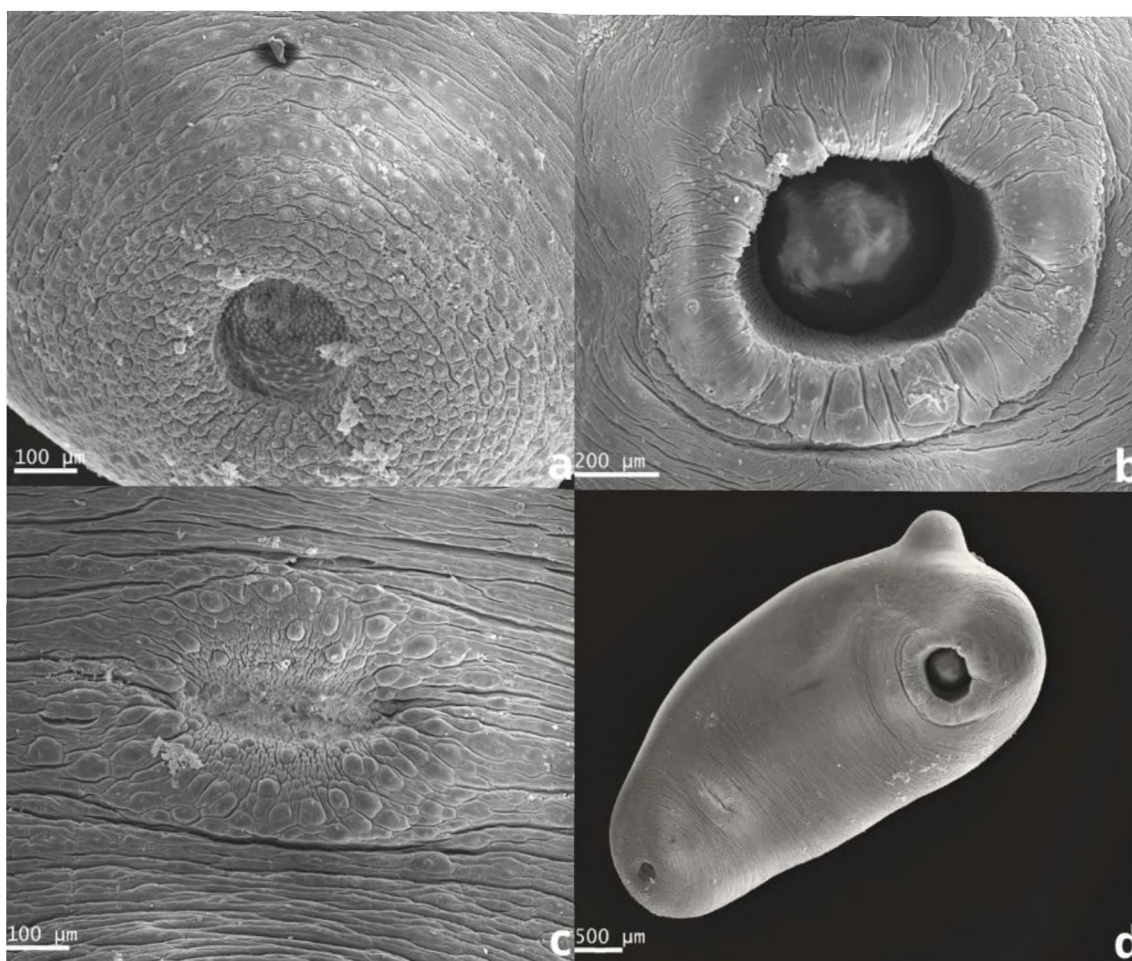


Imagen N° 10: *Trematodo 3MEB:* (a) *Extremo anterior con presencia de pequeñas papilas alrededor de la abertura oral (barra de escala: 100 μm).* (b) *Acetábulo (barra de escala: 200 μm).* (c) *Región del poro genital (barra de escala: 100 μm).* (d) *Parásito entero, vista ventral-lateral (barra de escala: 500 μm)*

El ejemplar 4MEB, también presenta cuerpo piriforme de 3,5 mm x 1,8 mm (Imagen N° 11d), ventosa oral con tegumento grueso y presencia de pequeñas papilas (Imagen N° 11b), acetábulo (Imagen N° 11a) y poro genital sin la presencia de la Bolsa de Cirro (Imagen N° 11c), por lo que es incluido en este grupo.

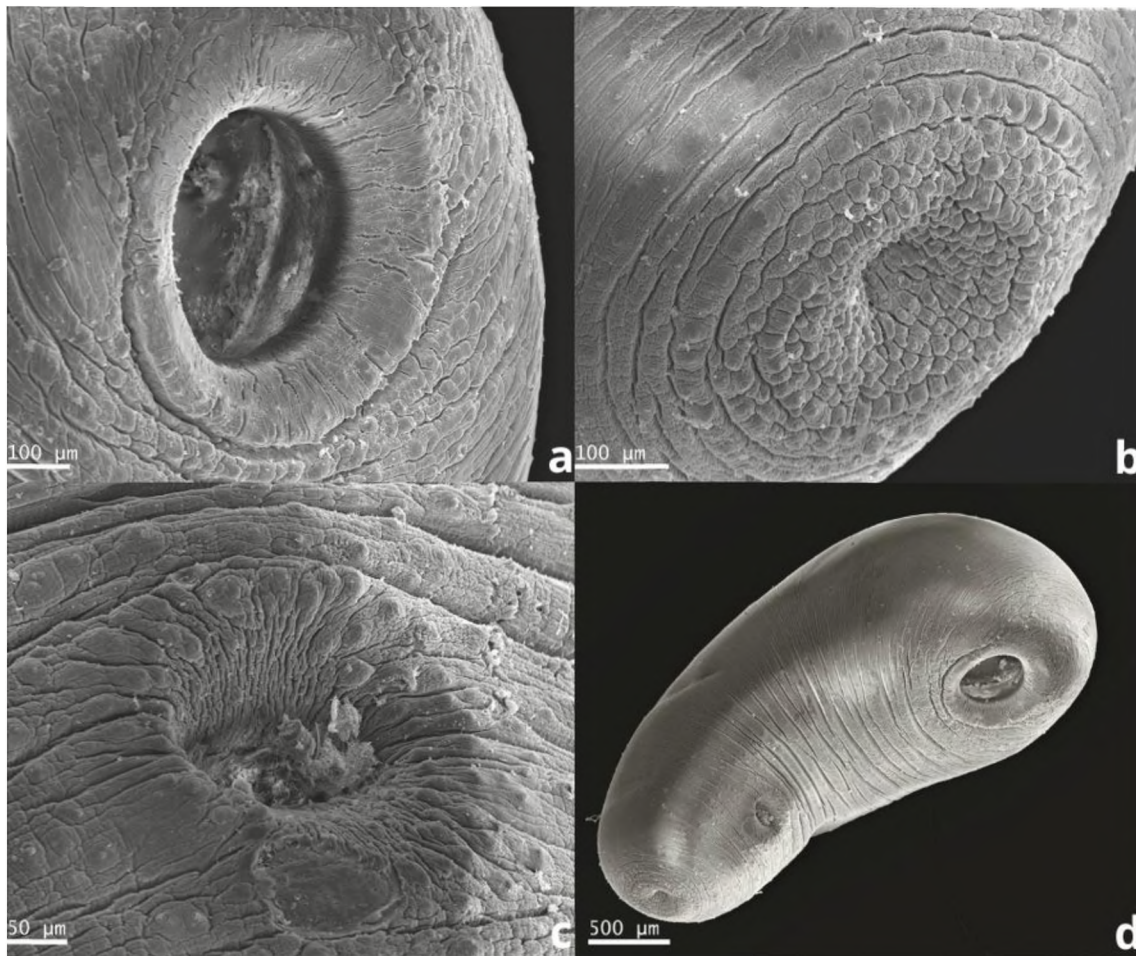


Imagen N° 13: Trematodo 4MEB: (a) Acetábulo (barra de escala: 100 μ m). (b) Extremo anterior con presencia de pequeñas papilas alrededor de la abertura oral (barra de escala: 100 μ m). (c) Región del poro genital (barra de escala: 50 μ m). (d) Parásito entero, vista ventral-lateral (barra de escala: 500 μ m)

Eduardo (1976) y Amato *et al.* (1986) describen que la bolsa del cirro sobresaliendo fuera de la superficie del cuerpo, junto con el tamaño del cuerpo, se pueden utilizar para separar macroscópicamente *B. anastrophus* de *Paramphistomum* sp. en infecciones asociadas.

Junquera (2007) cita que los paramfistomidos son especímenes cuyas características morfológicas son muy distintas, ya que no tienen la forma típica de las otras especies de trematodos. Estos en lugar de ser dorsoventralmente aplanados, son cónicos, cilíndricos, ovales, piriformes o elípticos y miden entre 5 – 13 mm de longitud x 2 - 5 mm de ancho según la especie, tienen forma cónica o piriforme y el color de los ejemplares adultos vivos va de grisáceo a rosado.

Quiroz Romero (1984) define que el género *Paramphistomum* tiene forma piriforme, ligeramente cóncavo y convexo dorsoventral, mientras que *Calicophoron* son cónicos, piriformes, algunas veces aplanados y curvados ventralmente, a diferencia del género *Cotylophoron* que son alargados, ovales y aplanados, pero los 3 géneros a nivel de la ventosa oral carecen de divertículos. Las mediciones típicas para *Calicophoron calicophorum* van de 11 a 13 x 5.5 a 7 mm, *Paramphistomum cervi* de 5 a 13 x 2 a 5 mm y *Cotylophoron Cotylophorum* de 5 a 8 x 2.5 a 3.5 mm.

Mientras tanto, *Balanorchis anastrophus* presenta un cuerpo pequeño, cónico, más ancho en la región pre-acetabular que puede variar de aspecto si los ejemplares están o no contraídos. Fischoeder (1901) agrega que, en los ejemplares no contraídos, se puede distinguir una proyección coniforme en la parte anterior, además de la proyección de la bolsa de cirro en ventral, situada pre-ecuatorialmente. Así mismo, Tandon y Maitra, (1982) detallan que se caracterizan por la carencia de una armadura de espinas en el cuerpo, que es reemplazada frecuentemente por papilas tegumentarias, que se presentan en toda la abertura oral y alrededor de los márgenes del acetábulo y que están constituidas por papilas ciliadas en forma de vellosidades y papilas no ciliadas, estos últimos asociados a estructuras sensoriales.

Algunos ejemplares fueron sometidos a cortes histológicos (Imagen N°14) para poder distinguir estructuras internas muy importantes dentro de la morfología de cada individuo.



Imagen N° 14. Procedimiento para la obtención de cortes histológicos de los parásitos en el Servicio de Histopatología y Citología de la FCV- UNNE. Observación bajo microscopía óptica.

El trematodo 1MOH, presenta una estructura normal, la pared del cuerpo con pliegues y surcos alternados como una capa superficial homogénea continua que cubre todo el cuerpo, se identificó la ventosa oral y el acetábulo, cerca de éste, un par de testículos y un ovario. Se observó vitelaria prominente en ambos lados del cuerpo. La membrana basal del tegumento mostró una capa clara y uniforme, con una capa parenquimatosa distinta por debajo y células vitelinas (Imagen N°15).

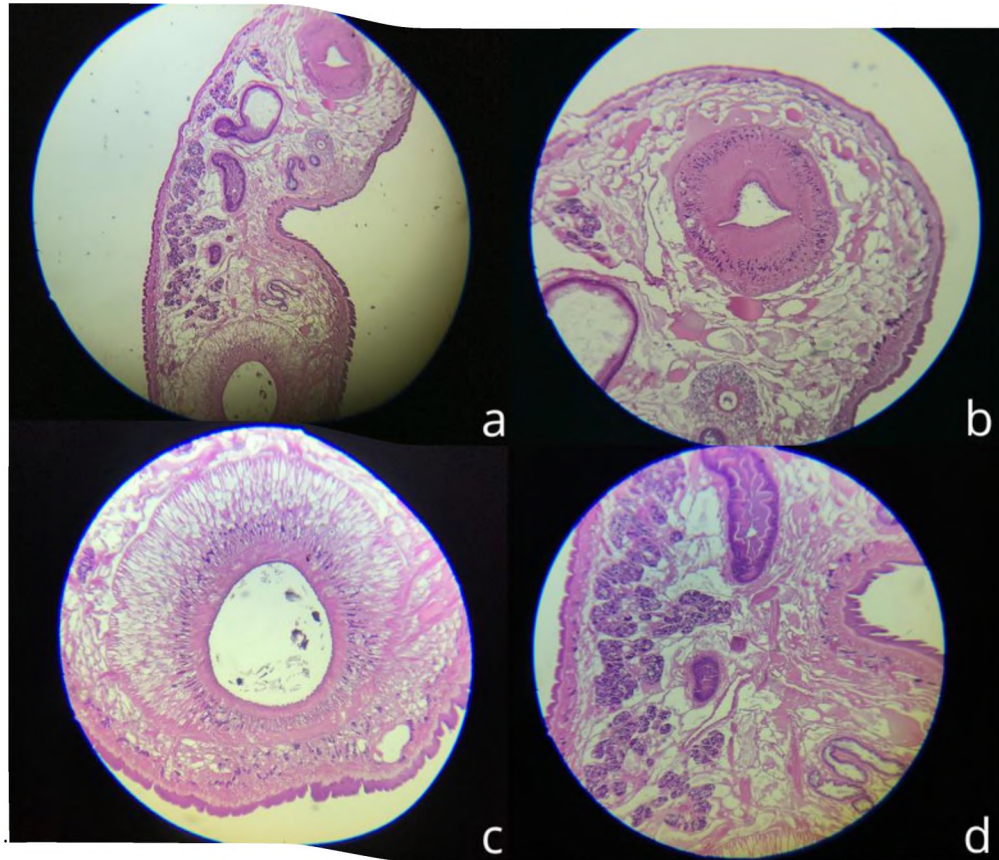


Imagen N° 15. IMO: (a) *Cuerpo entero, sección longitudinal.* (b) *Ventosa oral.* (c) *Acetábulo.* (d) *Región del poro genital.*

El trematodo 2MOH, presentó una estructura normal, la pared del cuerpo con pliegues pequeños y surcos alternados como una capa superficial homogénea continua que cubre todo el cuerpo, se identificó la ventosa oral con presencia de pequeñas estructuras como papilas ciliadas y el acetábulo, cerca de éste, un par de testículos y un ovario. La membrana basal del tegumento mostró una capa clara y uniforme, con una capa parenquimatosa distinta por debajo y células vitelinas (Imagen N°16).

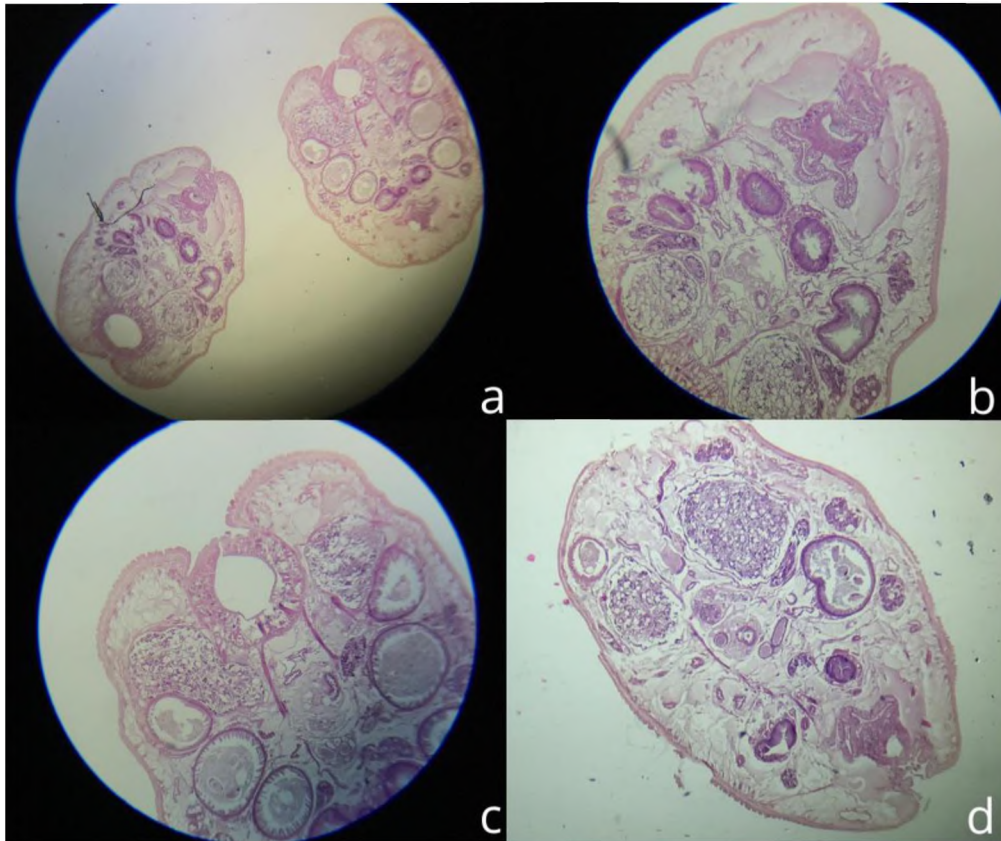


Imagen N° 16. 2MOH: (a) *Cuerpo entero de 2 parásitos con características morfológicas semejantes.*
 (b) *Ventosa Oral.* (c) *Acetábulo.* (d) *Cuerpo entero de 1 parásito con características semejantes.*

El corte histológico 3MOH permitió evidenciar a los parásitos entre las papilas ruminales, el trematodo allí evaluado, presentó una estructura normal, la pared del cuerpo fina, con pliegues pequeños y surcos alternados como una capa superficial homogénea continua que cubre todo el cuerpo, se identificó la ventosa oral y el acetábulo, cerca de éste, un par de testículos y un ovario. La membrana basal del tegumento mostró una capa clara y uniforme, con una capa parenquimatosa distinta por debajo y células vitelinas.

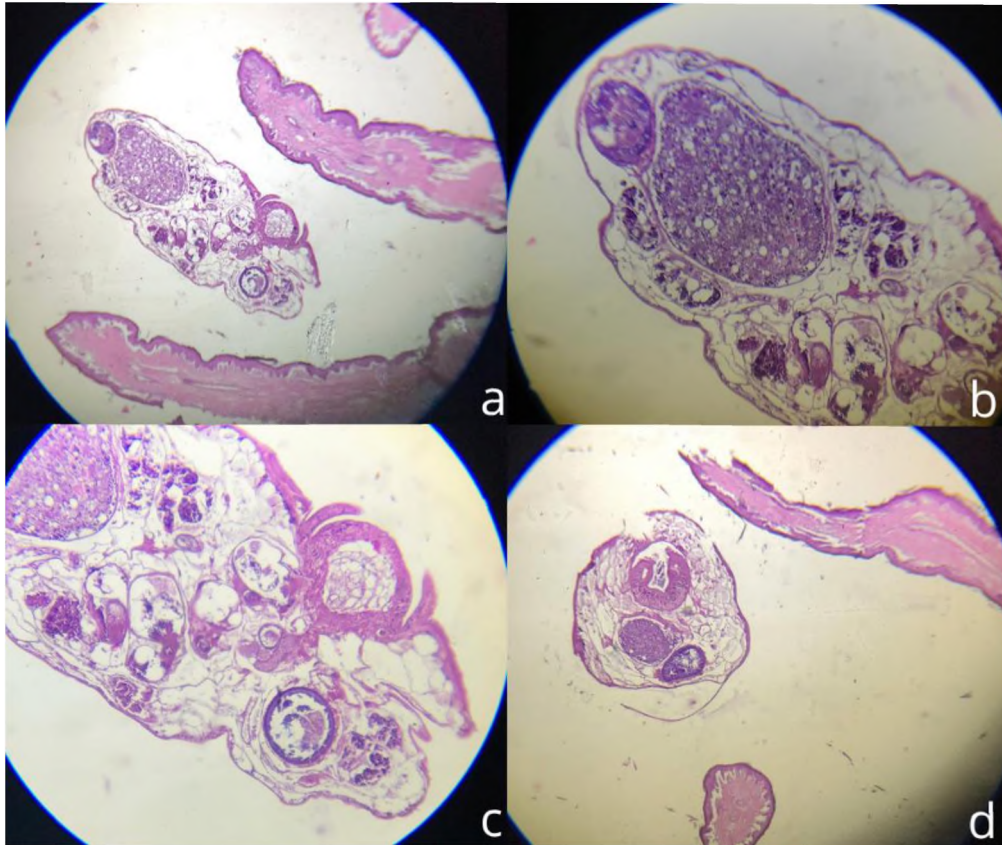


Imagen N° 17. 3MOH: (a) Cuerpo entero, sección longitudinal de un trematodo entre las papilas del rumen. (b) Ventosa oral. (c) Acetábulo. (d) Pequeño trematodo ubicado entre las papilas del rumen.

La identificación histológica registrada en el presente trabajo se realizó sobre la base de la histología de los trematodos; ventosa anterior, ventosa posterior (acetábulo), genitales terminales, testículos, ovario y sobre la base de las particularidades histológicas de los órganos musculares como la faringe, la abertura genital y la ventosa posterior (acetábulo). De acuerdo a los criterios señalados por Eduardo (1980) y Sey (1991).

Se puede determinar así, gracias a las características presentadas por nuestros ejemplares y comparando con los datos de bibliografía que los ejemplares del Grupo 1 pertenecen al género *Balanorchis* especie *anastrophus* y los ejemplares del Grupo 2 al género *Paramphistomum* spp., en este último no es posible determinar la especie presente ya que las características morfológicas son muy similares dentro del mismo género debiendo recurrir así en un futuro a técnicas moleculares.

CONCLUSIÓN

En base a los hallazgos, es concluyente que los búfalos en la zona estudiada son susceptibles a padecer un tipo más de parasitosis, diagnosticada anteriormente en bovinos y búfalos de otros países. Se pudieron obtener ejemplares de trematodos y realizarles algunas de las técnicas necesarias para su identificación taxonómica, basándonos tanto en las estructuras externas como internas, lo cual nos ha permitido

determinar el género, siendo una infestación mixta de *Paramphistomum sp.* y *Balanorchis anastrophus*, principalmente en su etapa adulta en el retículo-rumen.

La identificación final de *Paramphistomum sp.* y *B. anastrophus* se realizó en base a la morfología e histología de los trematodos; su forma, ventosa anterior (oral), ventosa posterior (acetábulo), poro genital, presencia o ausencia de la bolsa de cirro y papilas tegumentarias, siguiendo las pautas estándar dadas por Urquhart *et al.* (2001) y Sey (1991).

Se dificulta determinar la especie en el caso del género *Paramphistomum sp.*, ya que éste género es sumamente amplio y con un número mayor de especies involucradas dentro de él, las cuales son muy semejantes entre sí teniendo en cuenta solamente sus aspectos morfológicos e histológicos, y la clasificación taxonómica es una especialidad de la que lamentablemente carecemos de profesionales en el área, por lo que nos vemos en la necesidad de recurrir a exámenes moleculares para poder determinarlas.

En cambio, fue más sencillo poder determinar qué *Balanorchis anastrophus*, ya que éste es un ejemplar que posee cualidades muy diferentes al resto de los otros trematodos y hasta el momento solamente hay una especie descrita dentro de ese género.

Es necesario continuar con los estudios de ambas parasitosis para determinar si estas infestaciones provocan mermas productivas en la especie bubalina, reconocer sus huéspedes intermediarios y posibles tratamientos, como así también, y no menos importante, poner en práctica los exámenes coproparasitológicos en busca de huevos de ambos trematodos y poder realizar una minuciosa diferenciación con los de *Fasciola hepatica*, con quien comparten el ecosistema y similitud en los huevos al momento de la puesta lo cual puede llevar a una confusión, en operadores no tan experimentados, del verdadero diagnóstico. De esta manera, se podrán dar respuestas a los productores que explotan la actividad bubalina en las zonas anegadizas de la provincia de Corrientes.

BIBLIOGRAFÍA

- AMATO, JFR, VELÁZQUEZ MALDONADO, JJ, & AMATO, SB (1982). Infecciones conjuntas de bovinos por *Balanorchis anastrophus* Fiscoeder, 1901 y *Paramphistomum sp.* (Trematoda, Paramphistomidae) en Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. sujetadores. biol*, 371-5.
- BORCHERT, A. (1981). Parasitología Veterinaria. 3a ed. Zaragoza: Acribia. 741 p.
- CHAODHARY, V., HASNANI, J.J, KHYALIA, M.K, PANDEY, S., CHAUHAN, V.D, PANDYA, S.S Y PATEL, P.V. (2015). Identificación morfológica e histológica de *Paramphistomum cervi* (Trematoda: Paramphistoma) en el rumen de ovinos infectados.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M., ROJO VÁZQUEZ, F. A., MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R., SÁNCHEZ ACEDO, M. C., HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S., NAVARRETE LÓPEZ-COZAR, I., CARVALHO VARELA, M. (1999). Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana de España.
- DIRKSEN, G., DIETER GRUNDER, H., & STOBBER, M. A. T. T. H. A. E. U. S. (2005). Medicina Interna y cirugía del bovino. Volumen 1 y 2. 4a ed. Argentina: Intermédica.

- EDUARDO, S. L. (1983). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937. *Systematic Parasitology*, 5(1), 25-79.
- EDUARDO, S. L. (1980). The taxonomy of the family Paramphistomidae fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of the species occurring in ruminants. PhD thesis, London School of Hygiene & Tropical Medicine. DOI: <https://doi.org/10.17037/PUBS.00682240>
- FISCHOEDER, F. (1901) Die Paramphistomiden der Säugethiere. *Zoologischer Anzeiger*.
- ITAGAKI, T., TSUMAGARI, N., TSUTSUMI, K., CHINONE, S. (2003). Discrimination of three amphistome species by PCR-RFLP based on rDNA ITS2 markers. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 931-933.
- JUNQUERA P., (2007). *Paramphistomum* sp., gusanos trematodos parásitos del rumen en el ganado bovino, ovino y caprino: biología, prevención y control. Suiza.
- MURO, A., & RAMAJO, M. (2002). Paramfistomosis. *Parasitología veterinaria*. España: McGraw-Hill. p, 225-228.
- NIKANDER, S., & SAARI, S. (2007). Notable seasonal variation observed in the morphology of the reindeer rumen fluke (*Paramphistomum leydeni*) in Finland. *Rangifer*, 27(1).
- OVER, H. J., JANSEN, J., VAN OLM, P. W. (1992). Distribution and impact of helminth diseases of livestock in developing countries. *FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER*; FAO, Rome, Italy. 96 pp.
- QUIROZ ROMERO, H. (1984). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*.
- RACCIOPPI, O., LOMBARDERO, O. J., & MORIENA, R. (1994). *Cotylophoron cotylophorum* (Fiscoeder, 1901)(Trematoda: Paramphistomidae), nuevo parásito del bovino en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 3, 228.
- RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W., ARUNDEL, J. H., JACOBS, D. E., & VALLEDOR MARTÍNEZ, C. (2002). *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*.
- RIEU, E., RECCA, A., BÉNET, JJ, SAANA, M., DORCHIES, P. Y GUILLOT, J. (2007). Confiabilidad del diagnóstico coprológico de *Paramphistomum* sp. infección en vacas. *Parasitología veterinaria*, 146 (3-4), 249-253.
- RINALDI, L., PERUGINI, A. G., CAPUANO, F., FENIZIA, D., MUSELLA, V., VENEZIANO, V., CRINGOLI, G. (2005). Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 131: 247-253.
- SANABRIA, R.E.F. (2011). Ciclo vital de los paramphistomidos de rumiantes en regiones templadas de la República Argentina (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- SANABRIA, R.E.F., MARTORELLI, S.R. & ROMERO, J.R. (2009) Primer reporte de *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 (Trematoda: Paramphistomidae) en

Argentina, y re examinación de *Cotylophoron cotylophorum* sensu Racioppi et al. (1994). *Helmintología* 46, 225. <https://doi.org/10.2478/s11687-009-0042-7>.

- SANABRIA, R.E.F y ROMERO, J.R. (2008) Revisión y actualización de paramfistomosis. *Helmintología* 45, 64. <https://doi.org/10.2478/s11687-008-0012-5>
- SEY, O. (1991). *CRC Handbook of the Zoology of Amphistomes*. CRC press Inc. Boca Ratón, Florida. 480 pp.
- SINGH, R. P., PRASAD, K. D., ANSARI, M. Z., & SAHAI, B. N. (1983). Observation on intradermal skin test for diagnosis of *Paramphistomum cervi* in goats. *Indian Journal of Animal Health*.
- SOULSBY, E.J.L. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7a ed. México: Nueva Ed Interamericana. 823 p.
- TANDÓN, V. Y MAITRA, SC (1982). Observaciones con microscopio electrónico de barrido en las superficies tegumentarias de dos duelas del rumen (Trematoda: Paramphistomata). *Revista de helmintología*, 56 (2), 95-104.
- TAYLOR, M. O., COOP, R. L., & WALL, R. L. (2007). *Veterinary parasitology* 3rd Ed.
- URQUHART, G. M. (2001). *Parasitología veterinaria*.

ANEXO 1

PROTOCOLO DE NECROPSIA PARA TREMATODES (*Paramphistomum sp.*)

OBJETIVO:

- Tomar muestras para la obtención de trematodes del ganado bubalino.
- Identificar los parásitos obtenidos morfológicamente y molecularmente.

LUGARES DE TRABAJO:

- Establecimiento “Paso Laurel” se ubica en el paraje Paso Florentín, departamento de General paz, provincia de Corrientes (-27.747194, -57.748952).
- Laboratorio de Enfermedades Parasitarias – UNNE.
- Laboratorio de parasitología del laboratorio de diagnóstico e investigación veterinaria (CEDIVE) de la UNLP.

ANIMALES:

- Previa confirmación por coproparasitología se seleccionarán 2 búfalas adultas para realizar la necropsia (antecedente: 3 búfalas del mismo lote ya presentaron trematodes en el tubo digestivo).

MATERIALES:

- Balde de 12-15 l graduado (en su lateral con divisiones de 10 en 10 equivalentes al volumen del cucharón).
- Cucharón de capacidad conocida (B).
- Tamiz de 75 μ de abertura entre hilos (200 meshes)
- Abridor de intestino (o tijera punta roma).
- Bandejas grandes (de aproximadamente 40 x 50 cm de lado).
- Placas de Petri.
- Solución yodurada.
- Hiposulfito de sodio.

MÉTODOS:

- Sacrificar el animal.
- Observación externa de las vísceras
- Ligar cada porción del tubo digestivo para no perder y poder separar cada porción. Teniendo en cuenta que *Paramphistomum sp.* es un parásito que afectan al tracto gastrointestinal y que los estadios jóvenes se localizan en el intestino delgado y las fases adultas en el rumen y retículo, se hará la toma de muestras de todas las porciones.

ABOMASO:

- Abrir el abomaso por la curvatura menor y volcar el contenido en el balde. Lavar intensamente la mucosa (pliegue por pliegue) bajo un chorro de agua suave, friccionando cuidadosamente con los dedos para separar los parásitos adheridos.
- Medir el pH del contenido abomasal como indicador de la funcionalidad de dicho órgano. El pH normal oscila en 1.5-3, en tanto que en animales muy parasitados éste se eleva por encima de 5.

- Enrasar el contenido del balde agregando agua hasta la medida indicada inmediatamente por encima del nivel del líquido acumulado durante el lavado.
- Homogeneizar el contenido con el cucharón y extraer tantas medidas (cucharones) como sea necesario para completar una alícuota del 10% del total del lavado.
- Trasvasar la alícuota a un recipiente plástico (preferentemente de 1 l de capacidad). En caso de no leer la muestra en el momento, se la puede conservar en heladera, previo formolado al 4% (como conservador).

RUMEN, LIBRILLO Y REDECILLA: idem

INTESTINO DELGADO

- Abrir el intestino delgado con un enterótomo o con tijera, lavar la mucosa de manera similar a la del cuajar, y tomar la muestra de igual forma para completar una alícuota del 10%.

INTESTINO GRUESO

- Idem intestino delgado.

LECTURA

- Para la lectura de la muestra, tomar un 10% (cucharones) de la alícuota original y volcarlo sobre el tamiz de 75 μ de abertura entre hilos (200 meshes). Con una fina lluvia de agua, limpiar y clarificar la muestra.
- Volcar el lavado en una placa de Petri y agregar unas gotas de solución yodurada.
- Pasados 5-10 minutos, decolorar con hiposulfito de sodio.
- Mirar la muestra en una lupa estereoscópica a 10-20X y pasar los parásitos, con la ayuda de una aguja histológica, a otra placa de Petri con agua para su recuento e identificación.

FACTOR DE MULTIPLICACIÓN: El número de parásitos obtenidos debe ser multiplicado por 100. Este valor surge de multiplicar los dos porcentajes o alícuotas del 10% que se utilizaron.