



USO DE COX-1 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE TREMATODOS ADULTOS Y DE HUEVOS EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE RUMIANTES

Autor: Joan Sebastián Dávila Vera

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
INFORME FINAL
BOGOTÁ D.C
2018.**



USO DE COX-1 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE TREMATODOS ADULTOS Y DE HUEVOS EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE RUMIANTES

Autor: Joan Sebastián Dávila Vera

Asesor interno

**Ligia Consuelo Sánchez Leal
M.Sc**

Asesor externo

**Jimmy Jolman Vargas Duarte
Ph.D**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
INFORME FINAL
BOGOTÁ D.C
2018.**

DEDICATORIA

A mis padres que siempre estuvieron incondicionalmente para apoyarme en cada una de facetas que la vida me ha permitido vivir.

A mi hermana y sobrino quienes con su alegría han hecho que mi vida este llena de buenos recuerdos.

A Lina María quien ha sido un apoyo incondicional en todo momento, pues con su dulzura y belleza a puesto color a cada uno de mis días y con su amor me ha hecho sentir el hombre más afortunado del mundo.

A mis familiares, amigos y compañeros que a lo largo de mi vida han aportado un granito de arena para la construcción de mis logros.

A mis asesores Ligia Consuelo Sánchez Leal y Jimmy Jolman Vargas Duarte quienes más que mis asesores se han convertido a lo largo de este tiempo en mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia, ya que sin su apoyo y comprensión en todo momento no hubiese sido posible la finalización de este proyecto.

Al doctor Jimmy Jolman Vargas duarte y las profesoras Ligia Consuelo Sánchez Leal y Martha Posada; quienes con su conocimiento me guiaron a lo largo del desarrollo de este trabajo de grado brindando su confianza y apoyo incondicional.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca quien siendo mi alma mater me brindo por medio de sus docentes el conocimiento necesario para la realización de este proyecto.

Al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia que me acogió en sus laboratorios para poder llevar a cabo mi trabajo de grado.

A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron y guiaron para alcanzar las metas que había establecido.

Un poco más de persistencia, un poco más de esfuerzo, y lo que parecía irremediablemente un fracaso puede convertirse en un éxito glorioso.

-Elbert Hubbard.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	JUSTIFICACIÓN	2
3.	OBJTETIVOS.....	3
3.1.	Objetivo General	3
3.2.	Objetivos Específicos.....	3
4.	ANTECEDENTES	4
5.	MARCO TEÓRICO.....	6
5.1.	Generalidades de los trematodos	6
5.1.1.	Clasificación de trematodos	6
5.1.2.	Características morfológicas.....	7
5.2.	Hospederos	8
5.2.1.	Hospedero definitivo	8
5.2.2.	Hospedero intermediario.....	9
5.3.	Ciclo de vida.....	9
5.3.1.	Fasciola hepatica	9
5.3.2.	Paramfistómidos	12
5.4.	Cuadro clínico	12
5.4.1.	Fasciola hepatica	12
5.4.2.	Paramfistómidos	13
5.5.	Importancia económica.....	14
5.6.	Epidemiologia	16
5.7.	Técnicas de identificación de trematodos.....	17
5.7.1.	Técnicas microscópicas.....	18
5.7.1.1.	Coprológico.....	18
5.7.1.2.	Sedimentación de Dennis	18
5.7.1.3.	Sedimentación rápida.....	18
5.7.1.4.	Método de Faust e Ingalls	18
5.7.1.5.	Método de Jahnes y Hodge.....	19
5.7.1.6.	Método de Barody y Most	19
5.7.1.7.	Filtración/Sedimentación	19
5.7.1.8.	Tinción de contraste	19
5.7.1.9.	Técnicas inmunoenzimáticas.....	19

5.7.2.	Otros métodos de diagnóstico	20
5.7.2.1.	Diagnóstico clínico	20
5.7.2.2.	Diagnóstico por necropsia.....	20
5.7.2.3.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
6.	METODOLOGÍA	23
6.1.	Enfoque metodológico de la investigación	23
6.2.	Tipo y diseño de estudio	23
6.3.	Población.....	23
6.4.	Criterios de inclusión y exclusión.....	23
6.5.	Descripción de variables.....	24
6.5.1.	Variable dependiente	24
6.5.2.	Variable independiente.....	24
6.6.	procesamiento de las muestras.	24
6.6.1.	Fase 1. Obtención de parásitos adultos de trematodos, nematodos y cestodos, cultivo de larvas y recolección de muestras de materia fecal presuntamente contaminada con trematodos.	24
6.6.1.1.	Recolección de parásitos adultos pertenecientes a la clase trematoda.....	24
6.6.1.2.	Recolección de parásitos adultos pertenecientes a nematodos y cestodos	24
6.6.1.3.	Cultivo de larvas	25
6.6.1.4.	Recolección de materia fecal de animales con riesgo a presentar trematodosis.	25
6.6.2.	Fase 2. Extracción de ADN de parásitos adultos de trematodos, nematodos, cestodos, y pool de larvas para pruebas con el marcador mitocondrial COX-1	25
6.6.2.1.	Extracción de ADN de parásitos adultos de trematodos, nematodos, cestodos y pool de larvas.	25
6.6.2.2.	Amplificación por PCR	25
6.6.2.3.	Visualización de los productos de amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa	26
6.6.2.4.	Purificación de los amplificados en gel usando el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	26
6.6.2.5.	Secuenciación.....	27
6.6.3.	Fase 3. Prueba de los primers ParamCOX1 forward y reverse en muestras de materia fecal obtenidas en Concepción Santander	27

6.6.3.1. Identificación de huevos de trematodos por técnica de sedimentación rápida modificada en muestras de materia fecal	27
6.6.3.2. Verificación de nematodos y cestodos usando técnica de Mc Master	27
6.6.3.3. Extracción de ADN en muestras de materia fecal analizadas por las técnicas de sedimentación rápida modificada y técnica de Mc Master.	27
6.6.3.5. Visualización de los amplificadores de las muestras de materia fecal usando gel de agarosa.	28
7. RESULTADOS.....	29
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIONES.....	49
10. RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de la clase trematoda	7
Figura 2. Ciclo de vida de Fasciola hepática y paramfistómidos	11
Figura 3. Distribución de rumiantes de importancia ganadera en Colombia. ..	15
Figura 4. Distribución de Fasciola y paramfistómidos en el territorio nacional.	16
Figura 5. Distribución de fasciolosis a nivel mundial.	17
Figura 6. Distribución mundial de paramfistomidosis.....	17
Figura 7. Ubicación de los marcadores ribosomales ITS 1 y	21
Figura 8. Diagrama de parte del genoma mitocondrial de trematodos	22
Figura 9. tiempos usados para el desarrollo de la PCR con los primers ParamCOX-1	26
Figura 10. Parásitos adultos de trematodos.....	29
Figura 11. Parásito adulto de nematodo “ <i>Haemonchus contortus</i> ”	30
Figura 12. Parásito adulto de cestodo “ <i>Moniezia spp</i> ”.....	30
Figura 13. Procesamiento de materia fecal de ovejas de marengo	31
Figura 14. Larvas obtenidas a través de eclosión de huevos de materia fecal de ovinos	32
Figura 15. Muestras de materia fecal recolectadas de concepción Santander	32
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del marcador mitocondrial COX-1	33
Figura 17. Secuencia obtenida de la purificación del pozo 2.....	34
Figura 18. Visualización de la secuencia correspondiente a purificación del pozo 2 usando programa Bioedit.	35
Figura 20. Secuencia obtenida de la purificación del pozo 4.....	36
Figura 21. Visualización de la secuencia correspondiente a purificación del pozo 4 usando programa Bioedit.	36
Figura 22. Comparación A de la secuencia de ADN obtenida de la purificación del pozo 4 con las secuencias presentes en el GenBank usando BLAST	37
Figura 23. Comparación B de la secuencia de ADN obtenida de la purificación del pozo 4 con las secuencias presentes en el GenBank usando BLAST	37
Figura 24. Técnica de sedimentación rápida modificada paso a paso.....	38
Figura 25. Huevos de trematodos en muestras de materia fecal positivas por técnica de sedimentación rápida modificada.....	39
Figura 26. Técnica de Mc Master paso a paso.....	39

Figura 27. Huevos de nematodos y cestodos en muestras positivas mediante técnica de Mc Master.....	40
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de las muestras de materia fecal extraídas con fenol cloroformo y minikit de QIAamp y amplificadas con los Primers ParamCOX I F y R. Pozos	41
Figura 29. Electroforesis de muestra al azar y sus respectivas diluciones 1:10, 1:20 y 1:50	42
Figura 30. Pool de muestra de materia fecal secada en horno	42
Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con pool de muestras positivas de materia fecal secadas previamente en horno.....	43
Figura 32. Electroforesis de los productos amplificados del ADN de huevos obtenidos al revisar el pool de muestras usando cámara de Mc Master y recuperados con ayuda de pipeta Pasteur corridos con los primers ParamCOX I F y R	44
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del producto amplificado de las muestras de ADN extraídas con los kits comerciales ZR Plant/Seed DNA Kit™ y ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit.	44

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de ADN obtenido mediante técnica de fenol cloroformo y leídas usando el Nanodrop.....	33
Tabla 2. Cuantificación del ADN presente en las bandas purificadas correspondientes a las muestras de Fasciola hepatica (pozo 2) y Paramphistomum spp	34
Tabla 3. Datos de las muestras recolectadas de animales que cumplen con las condiciones de infección por trematodos.....	40
Tabla 4. Concentraciones de ADN cuantificadas en el Nanodrop correspondiente a muestras extraídas con el Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit y las muestras extraídas con fenol cloroformo.....	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección de parásitos adultos en rumiantes sacrificados mediante necropsia en campo	51
Anexo 2. Recolección de muestra de materia fecal	52
Anexo 3. Técnica de Mc Máster	53
Anexo 4. Técnica de coprocultivo para nematodos.....	54
Anexo 5. Extracción de ADN por el método fenol cloroformo	55
Anexo 6. Protocolo de amplificación de PCR para primers paramcox1	56
Anexo 7. Protocolo para electroforesis en geles de agarosa	57
Anexo 8. Preparación de los purificados para secuenciación.....	58
Anexo 9. Técnica de sedimentación rápida	59
Anexo 10. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias obtenidas ..	10

RESUMEN

Introducción: Los trematodos son parásitos que constituyen uno de los grupos más grandes del reino animalia, cuentan con gran distribución a nivel mundial afectando animales vertebrados e invertebrados. Desde sus inicios la trematodosis se ha posicionado como una enfermedad de gran importancia debido las grandes pérdidas económicas que genera a nivel agro-industrial.

Diversos métodos moleculares se han utilizado para la identificación específica de especies de *Fasciola* y su diferenciación, como las técnicas que utilizan marcadores genéticos ribosomales y ADN mitocondrial. COX es considerado el marcador universal para el código genético, ya que presenta una elevada tasa evolutiva, es específico de cada especie, y presenta alta variabilidad interespecífica, esto se debe a que el genoma mitocondrial es una de las regiones más conservadas.

Materiales y métodos: Se usó un set de primers de nucleótidos degenerados dirigidos hacia el marcador mitocondrial COX1 para amplificar parásitos de la clase trematoda. Se obtuvieron parásitos adultos de necropsias en campo y materia fecal de animales procedentes de fincas con presencia de *Fasciola hepatica*.

Resultados: Se encontró la amplificación positiva del marcador mitocondrial COX I en parásitos adultos realizando comparación morfológica y molecular de los resultados obtenidos; sin embargo, no se observó amplificación alguna en muestras de materia fecal.

Palabras clave: COX 1, Marcador mitocondrial, Trematodos, *Fasciola hepatica*, paramfistomidos.

ABSTRACT

Introduction: The trematodes are parasites that constitute one of the largest groups of the Animalia Kingdom, have great distribution worldwide affecting vertebrate and invertebrate animals. Since its inception the Trematodosis has positioned itself as a disease of great importance due to the great economic losses generated at agro-industrial level.

Various molecular methods have been used for the specific identification of *Fasciola* species and their differentiation, such as techniques using ribosomal genetic markers and mitochondrial DNA. COX is considered the universal marker for the genetic code, since it has a high evolutionary rate, is specific to each species, and has high interspecific variability, this is because the mitochondrial genome is one of the most preserved regions.

Materials and methods: a set of degenerated nucleotide primers directed towards the COX1 mitochondrial marker was used to amplify parasites of the Trematode class. We obtained adult parasites of necropsies in field and fecal matter of farm animals with presence of *Fasciola Hepatica*.

Results: Positive amplification of the COX I mitochondrial marker was found in adult parasites performing morfólica and molecular comparison of the results obtained; However, no amplification was observed in fecal matter samples.

Keywords: COX 1, mitochondrial marker, trematodes, *Fasciola hepatica*, Paramfistomidos.

1. INTRODUCCION

Los trematodos son parásitos que constituyen uno de los grupos más grandes del reino animalia, cuentan con gran distribución a nivel mundial afectando tanto vertebrados como invertebrados ⁽¹⁾. Desde sus inicios la trematodosis se ha posicionado como una enfermedad de gran importancia a nivel mundial debido a las grandes económicas generadas a nivel agro-industrial ⁽²⁾.

Los trematodos son parásitos comúnmente implicados en las parasitosis de rumiantes; los reportes de infección en Colombia relacionan a: *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Paramphistomum* spp, y *Cotylophoron* spp entre otros ^{(3) (4) (5) (6)}, sin embargo, *F. hepática* es el trematodo de mayor prevalencia ⁽⁷⁾.

Sin duda el diagnóstico más usado a nivel mundial es el análisis microscópico de huevos en heces ^{(8) (9)}; que posee una sensibilidad del 29% a 74% ^{(10) (11)}, aun así no se constituye como una técnica confiable ya que su resultado puede alterarse en caso de existir un aumento de parásitos inmaduros no productores de huevos ^{(4) (12)}.

En los últimos años, se han usado muchos marcadores moleculares para la identificación de trematodos en rumiantes, que destacan el uso de: espaciadores transcritos internos (ITS-1 y 2) como marcadores ribosomales, el complejo oxidasa (COX-1 al 3), Citocromo oxidasa b (Cytb) y el complejo deshidrogenasa (NAD 1 al 4) como marcadores mitocondriales, entre otros ^{(13) (14) (15) (16)}. COX y NAD constituyen los marcadores más usados ⁽¹⁷⁾. COX1 puede ser utilizado como marcador para la diferenciación de especies de parásitos y para la realización de árboles filogenéticos ⁽¹³⁾.

Por lo descrito anteriormente, este trabajo propone la identificación y una posible diferenciación de los trematodos *F. hepatica* y *Paramphistomum*, mediante la utilización de primers degenerados dirigidos al marcador mitocondrial COX 1 en muestras de parásitos y materia fecal, todo esto asociado además al análisis morfológico y comparaciones moleculares, incluida secuenciación, que permiten asegurar la presencia del parasito causal de la patología cursada en el animal.

2. JUSTIFICACIÓN

El genoma se ha constituido como la herramienta más importante para el diagnóstico; en parasitología se ha usado ampliamente el genoma mitocondrial, encontrando en la actualidad la secuenciación de 11 especies ⁽¹³⁾. Los datos obtenidos por medio del genoma mitocondrial son de gran valor debido a que permiten la realización de estudios que ayudan a la identificación, establecimiento de relaciones filogenéticas de especies, promoviendo el conocimiento de la ubicación y distribución de estas ⁽¹⁸⁾, permitiendo la identificación del material genómico necesario, sin generar impedimentos por la presencia del genoma del animal afectado ⁽¹⁹⁾.

Las técnicas encargadas de la identificación de huevos, aunque son patognomónicas para la presencia del parásito, no tienen una buena sensibilidad, a diferencia del método de ELISA que presenta una mayor sensibilidad y especificidad, esta se especializa en la captura de antígenos para la detección de anticuerpos que liberan algunos hospedadores contra el parásito, pero el protocolo para su desarrollo es mucho más complicado ⁽²⁰⁾.

Se han utilizado diversos métodos moleculares para la identificación y diferenciación de especies de *Fasciola*, como las técnicas que utilizan marcadores genéticos ribosomales y ADN mitocondrial ⁽¹⁵⁾. Cytb, citocromo oxidasa subunidad I (COX-1), NAD deshidrogenasa en conjunto representan solo el 13% de la diversidad de genes de la molécula mitocondrial; COX y NAD constituyen los marcadores más usados ⁽¹⁷⁾.

COX es considerado el marcador universal para el código genético, ya que presenta una elevada tasa evolutiva, es específico de cada especie, y presenta alta variabilidad interespecífica ⁽¹⁷⁾, esto se debe a que el genoma mitocondrial es una de las regiones más conservadas ⁽¹⁵⁾.

Sin embargo, en Colombia aún no se utiliza y, por lo tanto, el estudio actual propone el uso del marcador COX-1 como prueba diagnóstica de trematodos presentes en materia fecal de rumiantes, para generar la debida diferenciación entre especies morfológicamente similares y posibilitar el diagnóstico diferencial que es inespecífico por los métodos comúnmente utilizados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Identificar parásitos adultos y huevos de la clase de trematoda en muestras de materia fecal de rumiantes usando un set de primers dirigidos al marcador mitocondrial COX-1

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar morfológicamente parásitos adultos de la clase trematoda obtenidos por necropsia en campo.
- Estandarizar el uso del marcador mitocondrial COX-1 para la identificación de trematodos adultos de los géneros *Fasciola* spp. y Paramphistómidos.
- Aplicar el uso del marcador mitocondrial COXI para la identificación de huevos presentes en materia fecal de rumiantes.

4. ANTECEDENTES

Los primeros brotes de parásitos en Colombia datan de 1904 donde se observa la presencia de distomatosis hepática a cargo de un trematodo llamado *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*), caracterizado por afectar el hígado de una res en el matadero municipal de Medellín ⁽⁷⁾, para el año 1908 se sacrificaron 1.031 cabezas de ganado al encontrar la presencia de fasciolosis en la cual se encontró el parásito como el principal causante de la enfermedad visceral ⁽²¹⁾.

Para el año 1928 se reportaron 1.526 reses con fasciolosis tomándose como una enfermedad de gran prevalencia y mayor frecuencia provocando altas tasas de descarte de vísceras contaminadas; la cual causa grandes pérdidas económicas y elimina las pequeñas zonas de crianza ⁽⁷⁾.

Se considera que los hospedadores de trematodos más adecuados son los rumiantes tanto domésticos, como silvestres; su diagnóstico se realiza mediante un examen coprológico para la observación de los huevos característicos de la familia, encontrando un 29% de positividad, como siguiente paso se usan pruebas serológicas (ELISA) que arrojan como resultado el 65 % de positividad para la presencia de anticuerpos contra estos ⁽¹¹⁾.

En Venezuela se habla por primera vez de paramfistomidosis en el año 1935, después de encontrar *Cotylophoron cotylophorum* en la panza de bovinos; señalando que en este país no existe la presencia de *Paramphistomum cervi* ⁽⁹⁾. En México para el año 1975 se reporta por primera vez la presencia de *Paramphistomum cervi* en un bovino del género *Bos taurus* en la región de Loreto, aunque estudios posteriores indican la presencia de este parásito en otros países suramericanos como Venezuela, Brasil y Argentina ⁽²²⁾.

En Colombia el primer foco de paramfistomidosis se reporta en el año 2008, en rumiantes ubicados en el occidente del país ⁽³⁾, en el año 2009 se realizaron comparaciones morfológicas identificando la presencia de *Cotylophoron cotylophorum* y *Paramphistomum cervi* ⁽²³⁾, como trematodo presente en las muestras analizadas; para el año 2012 se realizaron comparaciones morfológicas que identificaron la presencia de *Cotylophoron panamensis* reportado por primera vez en el país ⁽⁶⁾.

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo, los paramfistómidos con mayor impacto en ganadería pertenecen a los géneros *Paramphistomum*, *Cotylophoron* y *Calicophoron* ⁽²⁰⁾. En la actualidad se conoce de la presencia de 9 especies de paramfistómidos en América entre los que se encuentran 3 especies de *Paramphistomum*: *P. cervi*, *P. leydeni*, *P. ichikawi* y 6 especies de *Cotylophoron*: *C.*

cotylophorum, *C. jacksoni*, *C. fuelleborni*, *C. panamensis*, *C. bareilliensis* y *C. travassosi* ⁽²³⁾.

Entre los agentes causantes de fasciolosis a nivel mundial encontramos a *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*; los animales con mayor predisposición a ser afectados son aquellos convalecientes y mal alimentados, lo que representa una mayor prevalencia en el ganado bovino ⁽⁷⁾.

El extraordinario avance de la tecnología biogenética, ha permitido crear técnicas capaces de estudiar y caracterizar a los individuos desde su unidad molecular más básica, el ADN. De acuerdo a ello, en los últimos años, se han desarrollado múltiples aplicaciones tecnológicas de la Biología Molecular en la Parasitología ⁽¹⁴⁾⁽²⁴⁾. Vargas y col. presentan un trabajo que por medio de técnicas moleculares realiza una aproximación en la caracterización molecular de *Fasciola hepatica*, argumentando que es un parásito de gran importancia y por ello es necesario adelantar estudios que permitan su identificación ⁽²⁴⁾.

En China e Irán se llevó a cabo la diferenciación de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* usando marcadores ribosomales y mitocondriales (ITS- 1 y 2, COX-1 y ND1) ⁽²⁵⁾. En la actualidad el uso de las técnicas moleculares se centra en el uso de ADN mitocondrial porque los datos obtenidos son valiosos para los estudios sobre la identificación de especies, filogenia y biogeografía ^{(1) (18)}.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Generalidades de los trematodos

Las trematodosis son un problema importante a nivel mundial, afectan a más de 750 millones de personas que ingieren alimentos contaminados, en estas se destacan dos grandes familias: *Paramphistomidae* y *Fasciolidae* ^{(1),(15) (26), (27)}. La Paramfistomidosis es una enfermedad que afecta a gran número de rumiantes de interés económico; sin embargo no existe una idea clara sobre su distribución mundial, por otro lado, la fasciolosis es una infección que afecta aproximadamente a 51 países, es caracterizada como una enfermedad emergente o reemergente y se ubica principalmente en Europa, América y Oceanía ^{(25), (30), (47)}.

Desde sus inicios la trematodosis se ha posicionado como una enfermedad de gran importancia a nivel mundial debido las grandes pérdidas económicas que genera a nivel agro-industrial ⁽²⁾. Los animales contraen la parasitosis al consumir berros, plantas o cualquier tipo de vegetal que este en contacto de agua contaminada con metacercarias (fase infectiva para el hospedero definitivo) ^{(15), (28)}. Una vez ingresadas al organismo se reproducen dando lugar a la enfermedad ⁽²⁶⁾.

A nivel mundial las especies con mayor carácter patógeno son: *Paramphistomum cervi*, *P. gotoi*, *P. gracile*, *P. microbothrium*, *P. leydeni*, *P. ichikawi*, *Cotylophoron cotylophorum*, *C. jacksoni*, *C. fuelleborni*, *C. panamensis*, *C. bareilliensis*, *C. travassosi*, *C. microbothrioides*, *Gastrothylax crumenifer*, *G. compressus*, *Carmyerius spatiosus*, *Calicophoron papillosum*, *Orthocoelium scoliocoelium*, *Explanatum explanatum* y recientemente, *Calicophoron calicophorn* en conjunto conocidos como paramfistómidos y *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* ^{(14), (20),(25), (26), (29), (30)}.

El reporte de casos de fasciolosis en humanos destaca su carácter zoonótico y de importancia pública; indicando que en América los países con mayor riesgo de adquisición de la enfermedad son Bolivia y Perú; se ubica la pobreza como el principal factor para su desarrollo ⁽³⁰⁾. Por el contrario, la paramfistomidosis no ha sido reportada en humanos hasta el momento, lo que la ubica como una enfermedad de importancia únicamente animal ⁽³¹⁾.

Entre los Paramphistómidos causales de enfermedad se encuentra *Paramphistomum cervi* como la especie más extendida a nivel mundial, con presencia en Europa, Asia, Norte América y Suramérica ⁽¹⁹⁾.

5.1.1. Clasificación de trematodos

La clase trematoda cuenta con una amplia rama de parásitos que la conforman, es necesario indicar que entre su clasificación los parásitos con importancia diagnóstica veterinaria se encuentran ubicados en la subclase Digenea (figura 1) ⁽³²⁾.

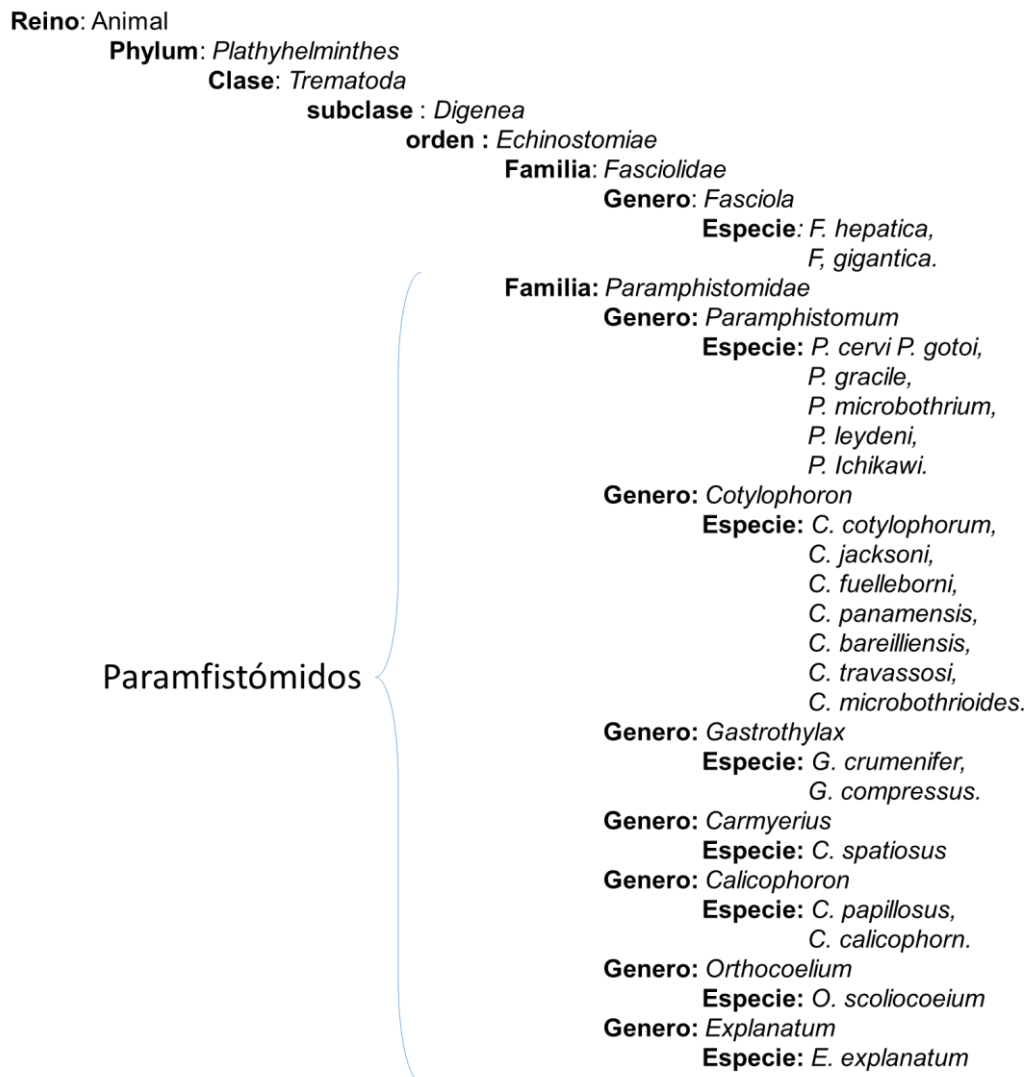


Figura 1. Clasificación taxonómica de la clase trematoda donde se indican los géneros y especies que hacen parte del grupo llamado paramfistómidos. Fuente: Elaboración propia, Modifica de Fuentes, M. 2015 ⁽³²⁾ y ⁽³³⁾.

5.1.2. Características morfológicas

Los trematodos son parásitos que cuentan con diferentes formas de adherencia y fijación, entre los órganos presentes en estos digeneos encontramos ventosas orales u órganos con diferentes disposiciones. Las ventosas pueden otorgar características importantes ayudando a su diferenciación y clasificación morfológica ⁽³⁴⁾.

Fasciola hepatica posee una ventosa oral y otra ventral, mejor conocida como dístoma, característica que la diferencia de los Paramphistómidos los cuales cuentan con una ventosa oral y un acetábulo muy desarrollado en la posición terminal conocido como anfistoma ⁽³⁴⁾. La identificación y diferenciación entre paramfistómidos

se realiza en los estadios adultos por medio de estudios morfológicos que involucran características de faringe, acetábulo y el atrio genital ⁽²⁶⁾.

Los trematodos necesitan de ciertos requisitos climáticos para poder incrementar su población, se ha descrito que no pueden desarrollarse en invierno por las bajas temperaturas ⁽³⁰⁾, se encuentran como condiciones favorables los climas tropicales y subtropicales, aunque en la actualidad se observa la presencia de estos en ambientes templados ^{(3) (14) (26) (29) (35) (36)}.

Cuando se encuentran en la etapa de huevo, miracidio, cercaría y metacercaría, su alimento básicamente es a través de una difusión producida en el tegumento al que se le conoce como alimentación pasiva; mientras que si el parásito se encuentra en un estadio adulto la ingesta de alimentos será regulada por el aparato digestivo y será conocida como alimentación activa ⁽³⁴⁾.

Los parásitos adultos no eliminan sus huevos de manera constante, existen variaciones horarias y diarias, sobre todo, variaciones estacionales que aumentan durante la primavera y el otoño; sin embargo, puede haber una contaminación continua de los pastos, producida por el ganado ovino; una sola oveja con una carga parasitaria importante puede llegar a eliminar entre 2 y 2,5 millones de huevos diarios ⁽¹¹⁾.

Paramfistómidos y *Fasciola hepatica* necesitan de un hospedero intermediario para continuar con su desarrollo, juntos utilizan un caracol pulmonado para completar su ciclo ⁽⁹⁾, estos pueden sufrir infecciones mixtas excretando cercarías tanto de *Fasciola* spp. como de paramfistómidos lo que genera coinfecciones ⁽²⁰⁾.

5.2. Hospederos

5.2.1. Hospedero definitivo

Los vertebrados son hospedadores definitivos para los trematodos, los cuales afectan en mayor medida a rumiantes como: Bovinos, ovinos y caprinos ⁽²⁶⁾, y en menor medida: Ciervos, camélidos, jirafas, gamos, corzos, alces, antílopes, cebús, gáyaes, equinos, cerdos, elefantes y jabalíes ⁽³¹⁾.

El ser humano es un hospedero accidental de la fasciolosis, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente 2,4 millones de personas tienen fasciolosis, mientras que 180 millones se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad ^{(24), (30)}.

5.2.2. Hospedero intermediario

Los trematodos involucran en su ciclo hospedadores intermediarios, para esto los caracoles pulmonados de agua dulce son de gran predilección. Las familias con mayor importancia a nivel mundial son *Planorbidae* (*Planorbis*, *Indoplanorbis*, *Helicorbis*, *Gyraulus*, *Anisus*, *Armiger*, *Segmentina*, etc.), *Bulinidae* (*Bulinus*) y *Lymnaeidae* (*Lymnaea*), las dos primeras familias son hospedadores intermediarios en África, Asia y Australia mientras que la última afecta en América y Europa ⁽²⁶⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³⁸⁾.

En Colombia entre los hospedadores intermediarios de mayor importancia se encuentran los caracoles del género *Lymnaea*, identificando a *Lymnaea bogotanensis* como el principal hospedador de *Fasciola hepatica* ⁽¹¹⁾ ⁽³⁸⁾ ⁽³⁹⁾. Los moluscos mayormente implicados como hospedadores intermediarios son: *Lymnaea columella* como un hospedador ocasional y *Galba truncatula* como hospedador principal para los focos de paramfistomidosis ⁽²⁰⁾.

El potencial biótico de estos moluscos es muy elevado, ya que en condiciones favorables a partir de un solo individuo se producen hasta 25.000 nuevos caracoles en aproximadamente tres meses. En épocas secas y calurosas los caracoles utilizan las fuentes, abrevaderos y regadíos como depósito cuando su actividad metabólica disminuye ⁽¹¹⁾. Su desarrollo normalmente se da en zonas pantanosas con agua de poco movimiento, vegetación alta y lugares que promuevan el empozamiento del agua como manglares y pequeños arroyos ⁽²⁾ ⁽³⁰⁾.

5.3. Ciclo de vida

Fasciola hepatica y los Paramphistómidos comparten algunas características de sus ciclos de vida y hospederos. Las diferencias se dan en la ubicación del estadio adulto y en caracteres morfológicos propios de cada especie (Figura 2).

5.3.1. Fasciola hepatica

Fasciola hepatica ingresa al rumiante (hospedero definitivo) mediante el consumo de berros, hiervas u otros vegetales que han estado en contacto de aguas contaminadas con el estadio infectante del parásito, mejor conocido como metacercaria. Una vez ingerido este viaja por el tubo digestivo y allí su envoltura es pre-digerida en el estómago e intestino delgado del rumiante por acción de la tripsina y las sales biliares descomponiendo la membrana que lo recubre promoviendo su liberación ⁽²⁸⁾ ⁽³⁴⁾.

Luego del proceso de desenquiste el parásito atraviesa la pared del intestino dirigiéndose hacia el peritoneo y allí penetra la cápsula de Glisson, alojándose en el hígado, lugar en donde se ubican los trematodos jóvenes alimentándose de

hepatocitos y causando lesiones propias de la enfermedad; este proceso dura aproximadamente 6 semanas. La migración por parte de las Fasciolas inmaduras puede dar lugar a direcciones erradas hacia otros órganos como el timo, pulmones, ganglios linfáticos y tejidos fetales de hembras preñadas ⁽¹¹⁾ ⁽³⁴⁾.

La infección alcanza los conductos y la vesícula biliar hasta completar la maduración del parásito en un tiempo aproximado de una semana ⁽²⁰⁾ ⁽³⁴⁾. El estadio adulto tiene forma de hoja de ciruelo o laurel, y un color marrón verdoso ⁽³⁹⁾, cuando está plenamente desarrollado mide hasta 5 cm de longitud y 1 cm de anchura; posee dos ventosas: ventral y oral, y un extremo cónico anterior donde se encuentra la boca; tiene el tegumento recubierto por numerosas espinas dirigidas hacia atrás ⁽¹¹⁾.

Al cabo de 8 semanas los parásitos adultos se auto fecundan, dando origen a huevos excretados con fluidos biliares, almacenándose en el intestino para salir a través de la materia fecal ⁽²⁰⁾ ⁽²⁸⁾; se calcula que una sola *Fasciola* tiene la capacidad de producir alrededor de unos 10.000 a 20.000 huevos al día ⁽³⁴⁾. Su morfología muestra las siguientes características: son elipsoidales, de color amarillento, tienen un opérculo y miden de 130 a 150 μm x 60 a 90 μm ⁽¹¹⁾.

El ciclo continua cuando los huevos llegan a un suelo con buenas condiciones de humedad, temperatura entre 10 y 30 °C la cual estimula el desarrollo del miracidio ⁽¹¹⁾ ⁽²⁰⁾ ⁽²⁸⁾, si el umbral se ubica a 10°C su crecimiento demorará cerca de 6 meses, si está por debajo del umbral establecido no podrá sobrevivir, por el contrario, si el umbral se encuentra entre 23 y 30°C el huevo madurará en unos 15 días aproximadamente ⁽³⁴⁾.

En ellos se produce una larva llamada miracidio que posee dos órganos foto receptores también conocidos como manchas oculares, se encuentra cubierto por flagelo que usa para movilizarse en medio acuático, dirigiéndose a su hospedador intermediario en un tiempo aproximado de 24 a 30 horas ⁽³⁰⁾ ⁽³⁴⁾.

La meta del miracidio es encontrar y penetrar el hospedador intermediario, en este caso un caracol de genero *Lymnea* ⁽¹⁰⁾ ⁽²⁸⁾ con la finalidad de fijarse a su cuerpo; como consecuencia de este proceso el miracidio pierde sus cilios y libera un contenido enzimático que le facilita el ingreso al caracol, en el interior pierde la cubierta ciliada migrando a la glándula digestiva donde se transforma en esporocisto ⁽³⁴⁾.

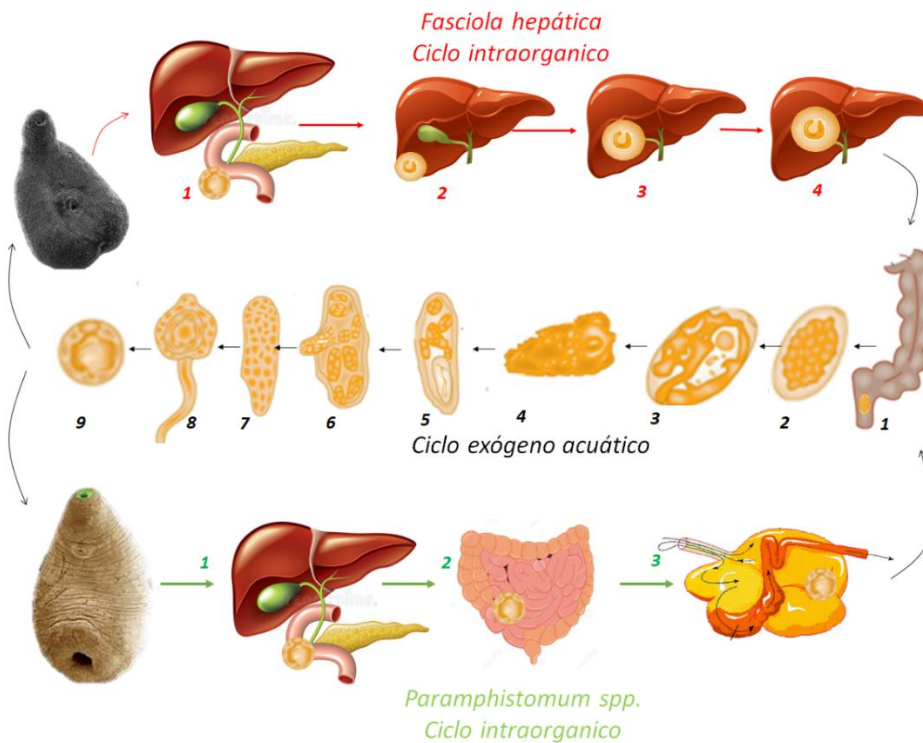


Figura 2. Ciclo de vida de *Fasciola hepática* y paramfistómidos. Convenciones: Negro, ciclo exógeno acuático (1) expulsión del huevo a través de materia fecal, (2) huevo del parásito (3) transformación de huevo a miracidio, (4) miracidio, (5) esporocisto, (6) redia de primera generación, (7) redia de segunda generación, (8) cercarías, (9) metacercarías; rojo *Fasciola hepática* ciclo intraorganico (1) duodeno "formas juveniles", (2) Cápsula de Glisson, (3) parénquima hepático, (4) conductos biliares "formas adultas"; verde, paramfistómidos (1) duodeno "formas juveniles", (2) pared de la mucosa intestinal, (3) rumen, retículo "formas adultas". Fuente: Elaboración propia, Modificado de Bonilla, R. 2016 ⁽²⁰⁾.

Por cada miracidio que ingresa en el caracol se desarrollan 4 esporocistos ⁽³⁾, sacos que tiene la función de retener y mantener células germinales, dando origen a la redia forma larvaria que se desarrolla en el interior del molusco, específicamente en el hepatopáncreas ⁽¹¹⁾ ⁽³⁴⁾. Se distinguen dos tipos de redias: redia madre y redia hija ⁽²⁸⁾.

La migración de la redia se da a través de la hemolinfa del caracol, lo que da lugar al siguiente estadio (cercarías) ⁽³⁾, el tiempo de infección en el hospedador intermedio varia de 8 a 10 semanas después de la penetración del miracidio hasta la salida de la cercarías; la cual abandona el caracol usando un flagelo para impulsarse en el medio acuático en busca de berros, hiervas u otro vegetal presente.

El proceso de enquistamiento de este estadio da origen a las metacercarías ⁽¹¹⁾, las cuales se caracterizan por ser sensibles a las altas temperaturas y a la desecación; sin embargo, poseen la capacidad de soportar temperaturas muy bajas. Estas metacercarías corresponden a la fase infectiva para el rumiante lo que mantiene el ciclo de transmisión presente en el ambiente de manera continua ⁽¹¹⁾ ⁽²⁸⁾.

5.3.2. Paramfistómidos

Esta familia cuenta con gran similitud a *Fasciola hepatica*, juntos infectan a rumiantes y necesitan de un caracol acuático que les sirve como hospedador intermediario (figura 2) ^{(3) (31)}. El ciclo inicia por el consumo de plantas o agua contaminada con metacercarías, en un tiempo aproximado de 24 horas. La metacercaría (estadio infectante) ingresa en el hospedero y viaja a través del rumen, abomaso y el intestino delgado; durante este recorrido su membrana es disuelta por el líquido ruminal, pepsina, ácido clorhídrico, tripsina y sales biliares en medio alcalino (en esta etapa no se desarrollan trastornos) ⁽²³⁾.

Cuando las formas juveniles son liberadas, se fijan a la mucosa y submucosa del intestino ^{(23) (31) (36)}; 6 a 8 semanas después los parásitos ubicados en el duodeno vuelven al abomaso produciendo pequeñas hemorragias, aspecto clínico que es causado por la presencia de espículas en el tegumento ⁽²⁾. Una vez completado su trayecto, llegan al rumen donde se alojan definitivamente ubicándose entre las microvellosidades hasta su estadio adulto. Los bovinos propician un ambiente que permite el desarrollo sexual de parásito en tiempo aproximado de 96 a 130 días y los ovinos y caprinos entre 96 y 107 ^{(3) (20) (23) (31)}.

Los estadios adultos producen huevos que serán liberados en la materia fecal del hospedero, estos al llegar a un suelo con óptimas condiciones de humedad darán origen al miracidio ^{(3) (31)} 17 días después de la eclosión; cuentan con un tiempo aproximado 4 horas para encontrar su hospedador intermediario; ingresando por la cavidad respiratoria, en la cual se desarrollan de 1 a 4 esporocistos en un tiempo aproximado de 12 a 21 días, y en condiciones óptimas dará origen a las redias hijas en un periodo aproximado de 20 días y redias nietas en aproximadamente 39 días ^{(3) (31)}.

La migración de las redias se da desde las glandulas del intestino medio a través de la hemolinfa formando así el estadio conocido como cercarías. El proceso de formación en el interior del caracol dura aproximadamente 2 meses, una vez transcurrido este tiempo la cercaría sale con ayuda de un flagelo que le permite impulsarse por el medio acuático hasta llegar a las plantas en las que se enquistas tomando el nombre de metacercaría, con el fin de infectar a su hospedero definitivo ^{(3) (31)}.

5.4. Cuadro clínico

5.4.1. Fasciola hepatica

En el ganado vacuno la fascioliosis puede presentarse en tres formas: aguda, subaguda y crónica. La forma aguda es poco común en bovinos, se produce cuando

los animales ingieren un número elevado de metacercarías durante tiempos cortos lo que garantiza que una gran cantidad de parásitos migren a la vez por el parénquima hepático produciendo signos y síntomas como: diarrea, debilidad, pérdida de peso, anemia, y muerte ^{(11) (38) (39)}.

La forma subaguda está producida por la presencia de estadios jóvenes que emigran libremente y estadios adultos en los conductos biliares; es producida por la ingestión de un número elevado de metacercarías durante un tiempo lo suficientemente largo como para no provocar un cuadro agudo ⁽¹¹⁾.

La fase crónica es mucho más frecuente, se presenta mayoritariamente en animales jóvenes; sus signos típicos incluyen: pérdida de peso, anemia hemorrágica, anorexia, hipoproteinemia y depresión general. La migración del parásito provoca una acción traumática que da lugar a trayectos necróticos como consecuencia de su reorganización y una fibrosis difusa del parénquima hepático que se puede ver en el lóbulo ventral, lugar de entrada de los parásitos ^{(11) (38)}.

En los conductos biliares, el traumatismo producido por los parásitos adultos provoca la aparición de una colangitis hiperplásica, dando lugar a un engrosamiento de la mucosa y un aumento en su tamaño; esta se hace permeable permitiendo el paso de proteínas plasmáticas, lo que da lugar a la hipoalbuminemia característica de la fasciolosis crónica ⁽¹¹⁾.

Los ovinos son más susceptibles a sufrir de fasciolosis, esto se debe a que producen fibrosis, una reacción preminentemente vascular; en infestaciones masivas no es difícil hallar formas agudas con hemorragias subcapsulares, anemia y muerte súbita, por otro lado, el tipo de reacción ejercida sobre el bovino en general es de forma crónica produciendo calcificación y proliferación de tejido conectivo, creando una barrera que evita el ingreso de formas juveniles ⁽³⁴⁾.

5.4.2. Paramfistómidos

Los paramfistómidos pueden producir dos tipos de infección, la intestinal producida por los parásitos juveniles migratorios o la ruminal causada por los estadios maduros. La fase intestinal es más patogénica ya los parásitos se adhieren y atraviesan la mucosa ocasionando un efecto traumático e irritativo, acompañado de petequias, erosiones, necrosis y lesiones intestinales, provocando en el animal: pérdida de peso, anemia, hipoproteinemia, edemas, emanación y en algunos casos anorexia ^{(3) (23) (36) (40)}; esto se debe a que el estadio juvenil realiza una migración retrograda hasta el rumen para poder promover la maduración del parásito ⁽²⁰⁾.

Las formas adultas pueden provocar alteraciones en las papilas ruminales provocando su adelgazamiento y desprendimiento afectando la productividad de los

rumiantes, también pueden llevar a cabo una acción expoliadora sobre lípidos y ácidos grasos presentes en el rumen ⁽²⁰⁾.

5.5. Importancia económica

El impacto económico que producen las trematodosis en el campo ganadero provoca en la industria pérdidas económicas evidenciadas en la disminución de la producción de leche, carne, disminución en la fertilidad y abortos a repetición ⁽³¹⁾ ⁽⁴¹⁾. La fasciolosis a nivel mundial produce pérdidas económicas estimadas en unos 2000 millones de dólares por año con una prevalencia de más de 600 millones de animales infectados ⁽³⁰⁾. Más 1,7 mil millones de pequeños rumiantes y 1,5 billones de ganado producen pérdidas a cargo de infecciones por trematodos ⁽³⁷⁾.

La paramfistomidosis también es conocida como fasciolosis intestinal o fasciolosis gástrica; es considerada una enfermedad de gran importancia en Estados Unidos, Australia, Sudáfrica e India ⁽³⁶⁾; sin embargo, es desconocida por parte del personal que trabaja en las fincas dificultando su tratamiento ⁽²⁰⁾, su mortalidad oscila entre el 80-96% en animales afectados ⁽³⁶⁾. México tiene la mayor tasa de prevalencia con un 96,5%, seguido por Perú con una tasa de 95,5% mostrando pérdidas económicas que alcanzan los 10,5 millones de dólares ⁽⁴⁰⁾, Cuba continúa en la lista con una tasa del 95,3%, Venezuela con 39%, Bolivia con 16,59% y Brasil con 3,32%, ⁽³⁰⁾ ⁽⁴²⁾.

En Colombia la ganadería tiene gran importancia en el sector agropecuario y nacional, la acción ganadera genera más de 400.000 empleos; se estima un total 22,5 millones de cabezas de ganado, de las cuales el 57,2% se destina para la producción de carne, el 3,3% para la producción de leche y el 39,5% para las dos. La producción lechera genera cerca del 1,3% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional y el 11% del PIB agropecuario; la mayor participación ganadera se dan en dos regiones: Norte con el 28,4% y Oriental con el 27,6% (figura 3) ⁽²⁰⁾.



Figura 3. Distribución de rumiantes de importancia ganadera en Colombia. Convenciones: (A) zona Norte, (B) zona Oriental. Fuente: Elaboración propia, Modificado de (<http://atlasgeografico.net/la-ganadera-en-colombia.html>)⁽⁴³⁾.

Las pérdidas reportadas en Colombia muestran valores de 12,483 millones de pesos^{(30) (44)}, la infección por *Fasciola hepatica* estima una prevalencia del 20% a 25% en bovinos dedicados a la industria lechera situadas en climas fríos ubicadas en Cundinamarca, Boyacá, Nariño y norte de Santander. Otras regiones de menor prevalencia aunque con la presencia del parásito son: Caldas, Cauca, Tolima, Huila⁽²⁰⁾. Las regiones de Antioquia y los llanos orientales presentan infección por paramfistómidos (figura 4)^{(3) (23) (41) (45)}.

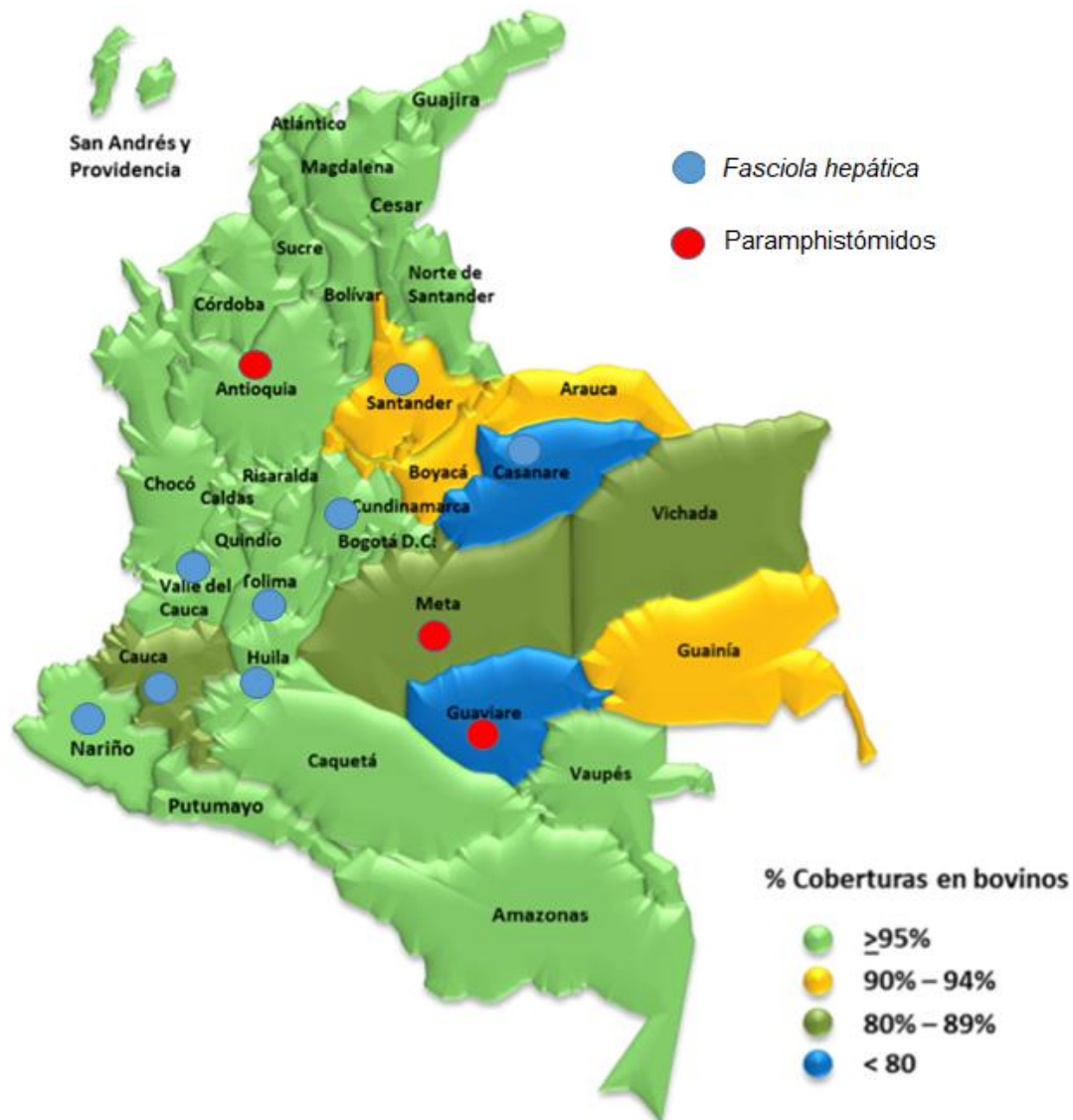


Figura 4. Distribución de *Fasciola* y paramphistómidos en el territorio nacional. Fuente: Elaboración propia. Modificado de: <http://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina> ⁽⁴⁶⁾.

5.6. Epidemiología

Las trematodosis son un problema importante a nivel mundial, afectan a más de 750 millones de personas que ingieren alimentos contaminados ⁽¹⁵⁾. La fasciolosis es una infección que afecta aproximadamente a 51 países, es caracterizada como una enfermedad emergente o reemergente ⁽⁴⁷⁾, (figura 5) ⁽³⁰⁾. Se ubica principalmente en Europa, América y Oceanía ⁽²⁵⁾.

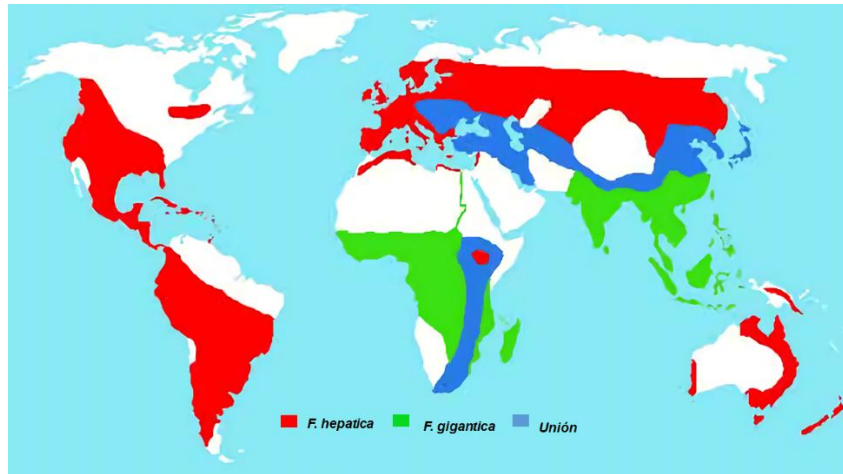


Figura 5. Distribución de fasciolosis a nivel mundial. Tomada de Diez, P. 2011 (27).

La OMS define como enfermedades emergentes aquellas “*nuevas enfermedades producidas por agentes no identificados anteriormente, causantes de problemas de salud pública*”. En este caso, nueva no significa desconocida hasta la fecha, sino, que en los últimos años se ha mejorado el conocimiento de su extensión y gravedad (48). La paramfistomidosis, aunque no es una enfermedad zoonótica tiene gran importancia en el aspecto ganadero. Los paramfistómidos están presentes en Diferentes países europeos, americanos y asiáticos (figura 6), los valores de prevalencia de paramfistomidosis se encuentran entre el 11% y 40% (2) (20) (22) (30) (49).



Figura 6. Distribución mundial de paramfistomidosis. Elaboración propia. Modificado de: https://es.123rf.com/photo_27471410_mapa-mundial.html (50)

5.7. Técnicas de identificación de trematodos

El diagnóstico microscópico es poco específico y por lo tanto no demuestra la prevalencia de la enfermedad producida por trematodos como *Fasciola hepática* y cobra mayor importancia cuando esta coexiste con otro trematodo perteneciente a la familia *Paramphistomidae*. Se ha encontrado que los huevos de ambos parásitos cuentan con características similares dificultando diagnóstico y posterior tratamiento (31) (40).

La prevención de las infecciones por trematodos no solo se debe enfocar en el control del hospedero intermediario evitando el desarrollo de su fase infectiva sino también se requiere de buenos métodos diagnósticos. Los métodos más usados son las técnicas coproscópicas, seguido de los métodos inmunoenzimáticos, los cuales son poco efectivos cuando se tiene el desconocimiento de otro tipo de trematodos, en este caso el animal estará más susceptible al contagio ⁽³⁾.

5.7.1. Técnicas microscópicas

5.7.1.1. Coprológico

Es un método que tiene como finalidad identificar la presencia de huevos en heces con una sensibilidad del 74% ⁽²⁰⁾; sin embargo, no es efectiva cuando solo hay presencia de parásitos juveniles. Es importante la localización del cigoto ya que este parámetro diferencia los huevos de paramfistómidos con los de *Fasciola hepatica*, estos cuentan con características como: color amarillo, dificultad para visualizar el opérculo y células embrionarias no diferenciadas, por su parte, los paramfistómidos son translucidos, el opérculo es visible y sus células embrionarias son fácilmente reconocibles ⁽³¹⁾.

5.7.1.2. Sedimentación de Dennis

Este método consiste en la obtención de huevos correspondientes a trematodos usando materia fecal de animales presuntamente infectados; sin embargo, la implementación de estos procedimientos cuenta con problemas técnicos al momento de la identificación de huevos ya que estos pueden quedarse atrapados en las mallas dando un resultado erróneo ^{(20) (51)}.

5.7.1.3. Sedimentación rápida

Esta técnica genera la separación de huevos por su densidad usando agua y la muestra de posible infección. De ser positiva la muestra en estudio, los huevos presentes en ella migraran hacia el fondo por tener una mayor densidad; al producto obtenido (precipitado) se le adiciona un colorante encargado de dar contraste al medio para identificar los huevos presentes. Esta técnica es especial para la identificación huevos de *Fasciola spp.* y *Paramphistomum spp.* ^{(31) (52)}.

5.7.1.4. Método de Faust e Ingalls

Es un método que mediante una solución con glicerina al 0,5 % y agua destilada permite la sedimentación de huevos de gran tamaño presentes en la materia fecal; es

útil para corroborar la existencia de larvas de *Strongyloides* y huevos de *Schistosoma* spp, *Ascaris* spp, *Fasciola* spp. y *Paramphistomum* spp. ⁽³¹⁾.

5.7.1.5. Método de Jahnes y Hodge

Permite la observación de huevos de gran tamaño realizando diluciones con alcohol etílico y agua, que permitirán la precipitación de las partículas más pesadas presentes en la materia fecal y por ende ubica los huevos en la parte inferior para su posterior análisis mediante microscopia ⁽³¹⁾.

5.7.1.6. Método de Baroody y Most

Su fundamento es similar al método de Faust e Ingalls; mediante la sedimentación de huevos de gran tamaño, permite su visualización en una preparación en fresco (lamina y laminilla) ⁽³¹⁾.

5.7.1.7. Filtración/Sedimentación

Es una técnica empleada para la búsqueda huevos de *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum* spp, presentes en muestras de materia fecal. Mediante la retención de la muestra a través de un tamiz permite generar una concentración de huevos que hace más precisa la posibilidad de identificación. A esto se une el uso de la técnica de sedimentación otorgando una mayor concentración de huevos ⁽⁵³⁾.

5.7.1.8. Tinción de contraste

Su objetivo es colorear las estructuras presentes en la muestra (huevos) utilizando colorantes como azul de metileno o verde de metileno a una concentración de 0,5 % diluidos en solución DSS (solución se prepara con detergente común, alumbre de Hierro 1% y agua destilada) ⁽²²⁾. Permite la diferenciación del huevo de *Fasciola hepatica* y Paramphistómidos mediante características morfologías presentes en la membrana de estos últimos la cual presenta una coloración azul verdoso, por otro lado, el huevo de *Fasciola hepatica* conserva su color amarillo característico de los fluidos biliares con lo que el huevo entra en contacto en el momento de su expulsión ⁽⁴⁰⁾.

5.7.1.9. Técnicas inmunoenzimáticas

El método de ELISA utiliza una proteína del tegumento del trematodo; posee una sensibilidad del 86% y una especificidad del 88% lo que la convierte en una alternativa útil y confiable ⁽²⁰⁾. A pesar de que los métodos inmunológicos permiten la detección temprana de parásitos causales de trematodosis y la detección en simultaneo de muchas muestras, presenta inmunidad cruzada frente a antígenos de diferentes

parásitos (Nematodos, Cestodos, etc) ⁽²⁰⁾. Así mismo las proteínas liberadas por los parásitos en el tracto gastrointestinal que pueden ser detectados en las heces para fines de diagnóstico. ⁽⁵⁴⁾.

5.7.2. Otros métodos de diagnóstico

5.7.2.1. Diagnóstico clínico

Su utilización en el diagnóstico de trematodosis debe considerar varios factores que pueden llegar a ser determinantes en la parasitosis como: manejo de los animales, terreno, presencia de caracoles acuáticos, historial de la enfermedad, cuadro clínico y los signos como: anorexia, polidipsia y diarrea con heces de olor fétido. ⁽³¹⁾.

5.7.2.2. Diagnóstico por necropsia

Se usa como complemento del diagnóstico clínico, mediante la observación de múltiples heridas desarrolladas por la migración de los parásitos a través del intestino. Signos de gran importancia son: enteritis hemorragias, necrosis, destrucción de las células glandulares y nerviosas, inflamación catarral, y la presencia de gran cantidad de parásitos color rosa pálido en la mucosa intestinal y en los folículos linfáticos ⁽³¹⁾.

5.7.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El desarrollo de nuevas técnicas más sensibles y específicas da origen a las pruebas moleculares y permiten el estudio de organismos desde su forma más básica, el ADN ⁽⁴⁵⁾. La parasitología ha sido una de las tantas disciplinas beneficiadas con estos métodos gracias a su facilidad para generar resultados concluyentes con alta especificidad y sensibilidad superando las limitaciones de los anteriores métodos, en este caso las pruebas coproscópicas ^{(19) (35)}.

La comprensión de los mecanismos moleculares en los últimos años ha permitido caracterizar los genomas de diferentes parásitos, identificando marcadores específicos los cuales permiten una clasificación entre especies ⁽¹⁴⁾. Esto se da porque cada microorganismo presenta una conformación distinta estimulada por la sustitución de nucleótidos o por inserción o delección de los mismos ⁽⁵⁵⁾, dilucidando la función, evolución y mecanismos evolutivos presentes en los parásitos, logrando realizar estudios más rápidos e importantes como la identificación y tipificación de agentes causales de parasitosis, la funcionalidad de muchos genes que permiten la expresión de perfiles entre especies o la codificación de posibles proteínas secretoras del parásito ⁽⁵⁶⁾; así mismo, los diferentes polimorfismos o incluso mutaciones genéticas sufridas, son una herramienta para la creación de técnicas que permitan establecer características etiológicas observando un posible comportamiento entre el hospedero y su relación con el medio ambiente ^{(18) (19) (24)}.

Entre los métodos moleculares el más usado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual es necesario tener conocimiento del fragmento de ADN que se desea utilizar como base de amplificación (24), de igual manera es importante realizar una buena extracción del material genético ya que este se ubica como un paso primordial en todo el proceso de identificación del microorganismo de estudio; entre las técnicas más usadas encontramos la extracción con fenol cloroformo, extracción con partículas magnéticas y el uso de kits comerciales ⁽⁵⁹⁾.

En el caso de trematodos se han usado marcadores tanto ribosomales como mitocondriales para el análisis de ADN. Los marcadores ribosomales más usados son los ITS 1 y 2, estas son regiones espaciadoras ubicadas entre las subunidades conservadas (18S, 5.8s Y 28s) que forman el ADN ribosomal (figura 7) encargado de codificar el ARN ribosomal, componente más importante del ribosoma ⁽⁵⁵⁾.

Tienen la capacidad de identificar especies basándose en la diferencia en el nivel de secuencias ya que son bastante cortas (entre 200 y 400pb) mostrando una tasa de evolución rápida ⁽⁵⁵⁾. Estudios realizados en varios países han comprobado que la diferenciación por estos fragmentos poseen alto grado de conservación no específica permitiendo el desarrollo de híbridos ⁽¹⁵⁾.

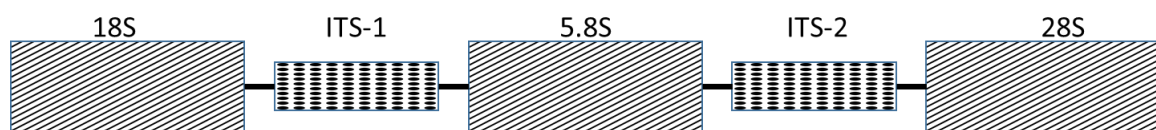


Figura 7. Ubicación de los marcadores ribosomales ITS 1 y 2. Fuente: Elaboración propia, Modificado de trabajo de Gissepe 2014 ⁽⁵⁵⁾.

Investigaciones recientes apoyan la iniciativa de trabajar con las mitocondrias por estar presentes en casi todas las células eucariotas, mostrando un genoma pequeño de forma circular y haploide. Su genoma es heredado en mayor medida por vía materna, aunque se han encontrado casos donde es heredado paternamente ⁽¹⁸⁾.

La mitocondria es la encargada del metabolismo respiratorio, codificando alrededor de 12 a 13 proteínas siendo un componente vital para los complejos de cadena respiratoria. Entre las regiones expresadas en la mitocondria encontramos por lo menos una región larga no codificante y una variable de longitud con un sitio encargado de la iniciación, dedicada a la replicación de algunas estructuras secundarias estables ⁽¹⁸⁾.

Actualmente el estudio de los marcadores mitocondriales avanza a un ritmo acelerado con respecto a los genes nucleares, son empleados en la diversificación de parásitos estrechamente relacionados logrando diferenciar especies que pertenecen a la misma familia, hallando caracteres demasiado específicos en regiones inter

específicas e intra específicas muy pequeñas, a diferencia de las que se presentan en especies que comparten la misma Clase o familia ^{(18) (35)}.

Entre la clasificación del genoma mitocondrial es importante resaltar que se encuentra dividido de acuerdo a su funcionalidad o codificación. Las regiones marcadas como SNR son conocidas por ser regiones no codificables, LNR son regiones que carecen de sitios de conocimiento para varias enzimas de restricción común, y las regiones específicas como su nombre lo indica son las encargadas de funciones específicas entre la mitocondria del parásito ⁽¹⁸⁾.

Estudios realizados mencionan que el genoma mitocondrial de *Fasciola hepatica* está compuesto por 14.462 nucleótidos organizando un genoma circular que tiene la capacidad de codificar alrededor de 12 proteínas como: el COX 1 a COX 3, Cytb , adenosina trifosfatasa 6 (atp6), NAD1, NAD6 y NAD4, dos genes que codifican para ARN ribosómico encargado de codificar ARN de transferencia⁽¹⁸⁾.

Yan y col. describen la primera secuenciación del genoma mitocondrial de *Paramphistomum cervi* usando 7 juegos de primers obtenidos de diferentes parásitos que sirvieron como base para la amplificación de este genoma ⁽¹⁹⁾. Los resultados obtenidos muestran que su genoma mitocondrial tiene una longitud de 14.014 pares de bases, constituido por 3364 aminoácidos. Contiene 12 genes codificantes para proteínas como: COX1 a 3, NAD1 a 6, NAD4L, atp6 y cytb, 22 genes de ARNt y 2 genes ARNr (rrnL y rrnS). Es importante indicar que todos los genes se transcriben en la misma dirección y que la disposición de genes codificantes de proteínas en *P. cervi* es la misma que la de *F. hepatica*, *O. felineus*, *P. westermani*, *S. turkestanicum*, *S. japonicum* y *S. mekongi*, pero diferente a la observada en *S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. spindale* ⁽¹⁹⁾.

Entre las regiones descritas en los genomas mitocondriales se ha estudiado ampliamente a COX1 (figura 8) para la diferenciación de especies de parásitos comprobando que esta es útil por su elevada tasa evolutiva como marcador molecular para diferenciar especies de parásitos, la realización de árboles filogenéticos, reconstrucción de historia demográfica, y diversificación adaptativa; además, es específico de cada especie presentando una alta variabilidad interespecífica ^{(18) (55)}.

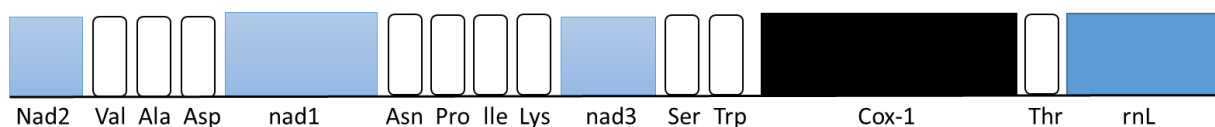


Figura 8. Diagrama de parte del genoma mitocondrial de trematodos modificado de Diagrama esquemático caja negra: citocromo c oxidasa subunidad I (cox1); cajas azules: genes circundantes; deshidrogenasa subunidad I, II y III (nad1, nad2, nad3), subunidad grande del gen ribosomal (rrnL); cajas blancas: Valina (Val), Alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), Asparagina (Asn), Prolina (Pro), Isoleucina (Ile), Lisina (Lys), serina (Ser), Triptofano (Trp), Treonina (Thr). Fuente: Elaboración propia, Modificada de Králová-Hromadová, I. 2008 ⁽⁶⁰⁾.

HIPÓTESIS

Se Identifican parásitos adultos y huevos de la clase de trematoda en muestras de materia fecal de rumiantes usando un set de primers dirigidos al marcador mitocondrial COX-1

6. METODOLOGÍA

6.1. Enfoque metodológico de la investigación

El presente estudio tiene un enfoque metodológico descriptivo.

6.2. Tipo y diseño de estudio

Esta investigación es de tipo experimental; utilizó ADN de parásitos adultos de los géneros *Fasciola* spp y *Paramphistomum* spp para evaluar la efectividad de un set de primers dirigidos al marcador mitocondrial COX-1, posteriormente fueron usados como control positivo al momento de analizar muestras de heces provenientes de animales infectados por trematodos con el fin de comparar con una prueba diagnóstica parasitológica.

6.3. Población

5 muestras de parásitos pertenecientes al género *Fasciola* spp procedentes de animales infectados ubicados en Nobsa Boyacá obtenidos durante valoración post mortem. 5 muestras de parásitos pertenecientes al género *Paramphistomum* spp procedentes de animales infectados ubicados en Villavicencio Meta obtenidos durante valoración post mortem y 10 muestras de materia fecal procedentes de una zona con reportes de infección por *Fasciola hepatica* ubicados en el municipio de Concepción Santander.

6.4. Criterios de inclusión y exclusión

Identificación morfológica compatible con los géneros propuestos, integridad morfológica del parásito y para las muestras de heces que procedieran de fincas con diagnósticos previos positivos a infección por *Fasciola hepatica*. Para los coprocultivos muestras de materia fecal de animales infectados con estrongilidos con cargas iguales o mayores a 500 huevos/gramo.

6.5. Descripción de variables

6.5.1. Variable dependiente

Obtención de un amplificado a partir del uso de un marcador mitocondrial (COX-1) en ADN de parásitos adultos y ADN presente en muestras de materia fecal.

6.5.2. Variable independiente

El género al que pertenece cada parásito evaluado.

6.6. procesamiento de las muestras.

6.6.1. Fase 1. Obtención de parásitos adultos de trematodos, nematodos y cestodos, cultivo de larvas y recolección de muestras de materia fecal presuntamente contaminada con trematodos.

6.6.1.1. Recolección de parásitos adultos pertenecientes a la clase trematoda.

La recolección de *Fasciola hepatica* se realizó en Nobsa Boyacá ubicado en el centro-oriente del territorio colombiano, con ayuda del doctor Carlos Vega se inspecciono el hígado y conductos biliares mediante necropsia en campo buscando en el órgano y la presencia del parásito adulto; una vez localizado el parásito se identificó morfológicamente observando características específicas como: forma de hoja, ventosa oral y ventral y forma aplanada.

Se extrajo *Paramphistomum* spp. en Villavicencio Meta, municipio situado en el piedemonte de la cordillera oriental con ayuda del doctor Rodrigo Bonilla por necropsia en campo de bovinos que presentan infección en el rumen. La identificación de ellos también fue realizada por características morfológicas teniendo en cuenta que el parásito hallado debe tener una forma conoide, una ventosa ventral en la parte posterior y presencia de faringe. Los pasos usados en la recolección de parásitos adultos por necropsia en campo se encuentran descritos en el anexo 1.

6.6.1.2. Recolección de parásitos adultos pertenecientes a nematodos y cestodos

La búsqueda de nematodos y cestodos se realizó en necropsias de ovejas pertenecientes al centro agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia, el nematodo adulto tenido en cuenta para el estudio fue *Haemonchus contortus*. La identificación se llevó a cabo microscópicamente observando la presencia de papilas cervicales, cola en punta y en el caso de las hembras la solapa o lengüeta supravulvar. El cestodo de elección fue *Moniezia* spp, se tuvo en cuenta

el escólex, la presencia de ventosas y las proglotides. Se analizó el abomaso e intestinos de animales siguiendo los pasos descritos en el anexo 1.

6.6.1.3. Cultivo de larvas

El cultivo de larvas se realizó a partir de muestras de materia fecal obtenidas de un grupo de ovejas infectadas por nematodos pertenecientes al centro agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo 2). Una vez extraída la muestra de materia fecal se realizó técnica de Mc Master (Anexo 3) para visualizar la presencia de huevos en las muestras.

Las muestras que tuvieron un resultado positivo se procesaron con la técnica de coprocultivo (Anexo 4), con el fin de eclosionar los huevos de nematodos para poder extraer las larvas de la materia fecal y posteriormente almacenarlas a 4°C hasta realizar la extracción de ADN.

6.6.1.4. Recolección de materia fecal de animales con riesgo a presentar trematodosis.

Se recolectaron 10 muestras de materia fecal en una finca ubicada en el municipio de concepción Santander, la cual cuenta con estudios previos que identifican la presencia de trematodos en ovinos; para la obtención de las muestras de materia fecal se siguió el protocolo descrito en el Anexo 2, una vez recogidas las muestras fueron llevadas al laboratorio 8 del Instituto de Genética de la universidad Nacional de Colombia y almacenadas a 4°C hasta su uso.

6.6.2. Fase 2. Extracción de ADN de parásitos adultos de trematodos, nematodos, cestodos, y pool de larvas para pruebas con el marcador mitocondrial COX-1

6.6.2.1. Extracción de ADN de parásitos adultos de trematodos, nematodos, cestodos y pool de larvas.

Se realizó extracción de ADN a los parásitos adultos de trematodos obtenidos por necropsia en campo, a los nematodos, cestodos y pool de larvas obtenidos en Marengo usando la técnica de fenol cloroformo (Anexo 5). Una vez resuspendidas las muestras se realiza cuantificación con ayuda del Nanodrop 2000.

6.6.2.2. Amplificación por PCR.

La PCR se realizó de acuerdo a los parámetros descritos en la lista de protocolos presentes en el laboratorio 8 del Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo 6). Las muestras se montaron por duplicado y se amplificaron en el

termociclador MaxyGene Gradient; Los primers usados para la identificación del marcador mitocondrial COX-1 fueron primers degenerados ParamCOX1 Foward (5'-GAT CCT GTK TTR TTT CAG CA -3') y ParamCOX1 Reverse (5'- TAA AGA HAR HAC ATA ATG AAA ATG A -3') creados en el instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia. Las muestras de nematodos, cestodos y pool de larvas fueron usadas como un control de amplificación para el protocolo el protocolo de PCR realizado debido a que los primers fueron diseñados para la posible identificación de cualquier tipo de parásito perteneciente a la clase trematoda.

Los tiempos asignados en la PCR son descritos en la Figura 9; los productos de la amplificación fueron conservados a 4°C hasta la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa.

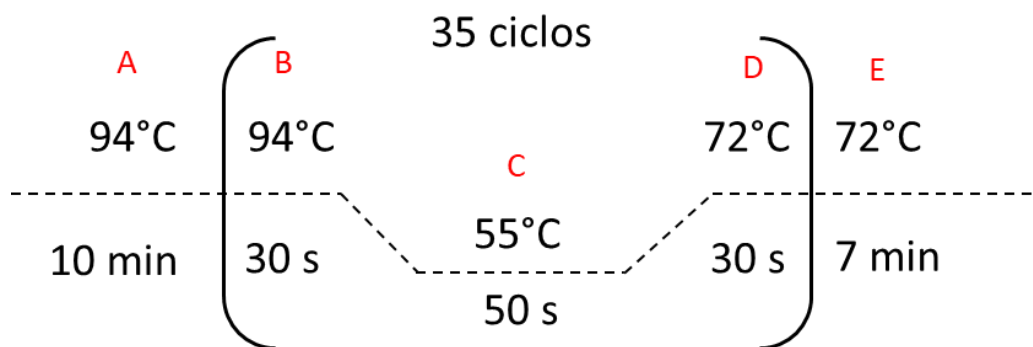


Figura 9. tiempos usados para el desarrollo de la PCR con los primers ParamCOX-1 (A) desnaturalización inicial. (B) desnaturalización. (C) alineación. (D) extensión. (E) extensión final. Fuente: Elaboración propia, Modificado del esquema realizado por Gissepe en 2014 (55).

6.6.2.3. Visualización de los productos de amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar las muestras amplificadas se realizó un gel de agarosa con una concentración al 1.5%, el voltaje, tiempo y amperaje se cuadro de acuerdo a los protocolos establecidos en laboratorio 8 del Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia descrito en el Anexo 7.

6.6.2.4. Purificación de los amplificados en gel usando el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit

Se escogieron 2 bandas positivas para la amplificación de ADN pertenecientes a parasitos adultos de *Fasciola hepatica* y *Paramfistomum*, las cuales fueron cortadas y purificadas usando el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de acuerdo a las condiciones del fabricante y cuantificadas en el Nanodrop 2000; posteriormente se enviaron al servicio de secuenciación del instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia usando el procedimiento descrito en el Anexo 8.

6.6.2.5. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador Sanger ABI PRISM 3100 siguiendo el protocolo establecido en el servicio de secuenciación del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Los resultados fueron leídos en un editor de secuencias y alineamientos llamado Bioedit, posteriormente se compararon las secuencias en el GenBank usando el BLAST para identificar si realmente los parásitos correspondían a los descritos técnicas morfológicas.

6.6.3. Fase 3. Prueba de los primers ParamCOX1 forward y reverse en muestras de materia fecal obtenidas en Concepción Santander

6.6.3.1. Identificación de huevos de trematodos por técnica de sedimentación rápida modificada en muestras de materia fecal

Se usó la técnica de sedimentación rápida modificada (Anexo 9) porque es el método de análisis parasitológico más usado en la actualidad para la identificación de huevos de trematodos presentes en muestras de materia fecal, estos se ubican en el fondo del recipiente después de hacer una serie de lavados con agua con el fin de eliminar elementos con menor peso facilitando así su identificación.

6.6.3.2. Verificación de nematodos y cestodos usando técnica de Mc Master

Las muestras analizadas mediante técnica de sedimentación rápida modificada fueron analizadas con la técnica de Mc Master (Anexo 3) para observar la presencia de nematodos y cestodos con el fin de identificar las diferentes clases de parásitos presentes en las mismas, teniendo en cuenta que un animal nunca estará infectado con un único parásito.

6.6.3.3. Extracción de ADN en muestras de materia fecal analizadas por las técnicas de sedimentación rápida modificada y técnica de Mc Master.

Se usaron diferentes técnicas para obtener el ADN de las muestras, inicialmente las 10 muestras traídas de Concepción Santander fueron procesadas mediante la técnica de fenol cloroformo (Anexo 6), de las cuales, las muestras positivas para la presencia de trematodos por técnica de sedimentación rápida modificada fueron procesadas usando el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit. Se decide tomar una muestra al azar de los extraídos con QIAamp DNA Mini Kit, se diluyó 1:10, 1:20 y 1:50, a continuación, se realizó PCR y visualización del gel de agarosa al 1.5%.

Se realizó un pool con las muestras positivas para la presencia de trematodos mediante la técnica de sedimentación rápida modificada con el fin de aumentar la concentración de huevos, se secaron en horno y posteriormente se les realizó

extracción de ADN con el método de fenol cloroformo (Anexo 6) y con el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit, posterior a esto las muestras se cuantificaron en el Nanodrop 2000 y se diluyeron así: 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200.

Adicional a esto, se realizó lectura con cámara de Mc Master al pool de muestras, a los montajes con mayor visualización de huevos se les realizó aspiración del contenido con pipeta Pasteur para la recuperación de huevos y se depositó en tubos de eppendorf de 1.5 ml para ser procesados con técnica de fenol cloroformo.

Por último, al pool de muestras previamente secado en horno se realiza extracción de ADN con kits el ZR Plant/Seed DNA Kit™ y el ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante, se tiene en cuenta que el primer kit es especializado en la obtención de ADN procedente de semillas o cualquier tipo de material vegetal y el segundo kit es usado la obtención de ADN en muestras difíciles como heces, suelo, agua, biofilms, hisopos y fluidos corporales entre otros, estos kits se utilizaron para obtener un mejor resultado, teniendo en cuenta que las heces son un material de difícil extracción.

6.6.3.4. PCR de las muestras de ADN extraídas de materia fecal.

Se realiza PCR a las muestras extraídas por los diferentes métodos anteriormente mencionados usando los mismos tiempos plasmados en la Figura 9 y siguiendo los lineamientos descritos en el Anexo 4.

6.6.3.5. Visualización de los amplificadores de las muestras de materia fecal usando gel de agarosa.

Se realizó un gel de agarosa con una concentración de 1.5%, el voltaje, tiempo y amperaje se cuadro de acuerdo a los protocolos establecidos en laboratorio 8 del Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia descrito en el anexo 8.

7. RESULTADOS

Fase 1. Obtención de parásitos adultos de trematodos, nematodos y cestodos, cultivo de larvas y recolección de muestras de materia fecal presuntamente contaminada con trematodos.

Para la identificación de cada uno de los parásitos se tuvo en cuenta características morfológicas propias de cada especie y su localización entre el cuerpo del hospedero fue un punto importante al momento de la extracción. Se encontraron 5 parásitos pertenecientes a *Fasciola hepatica* y 5 parásitos pertenecientes a *Paramphistomum* obtenidas por necropsia en campo (Figura 10). Se obtuvieron 5 parásitos pertenecientes a *Haemonchus contortus* y 5 parásitos pertenecientes a *Moniezia* spp obtenidas por necropsia en campo (Figura 11 y 12).

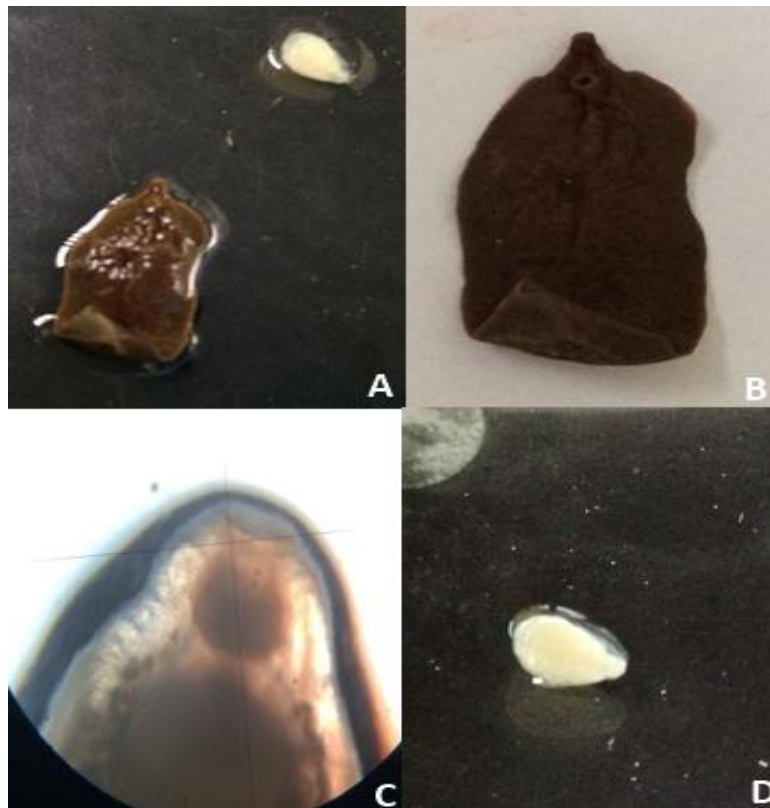


Figura 10. Parásitos adultos de trematodos. (A) *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum* spp. (B) Adulto de *Fasciola hepatica* donde se observa la ventosa oral y ventral. (C) *Paramphistomum* spp en microscopio donde se observa la ventosa oral. (D) Adulto de *Paramphistomum* spp. Fotos tomadas por el doctor Jimmy Vargas.

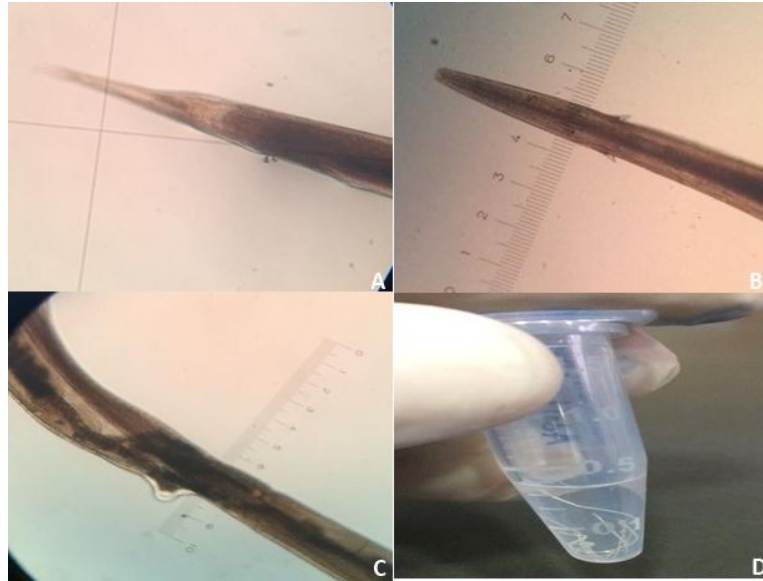


Figura 11. Parásito adulto de nematodo “*Haemonchus contortus*”. (A) Cola en punta. (B) Papilas cervicales notorias. (C) Hembra mostrando la solapa o lengüeta supravulvar. (D) Larva visualizada macroscópicamente. Fotos tomadas por el Doctor Jimmy Vargas.

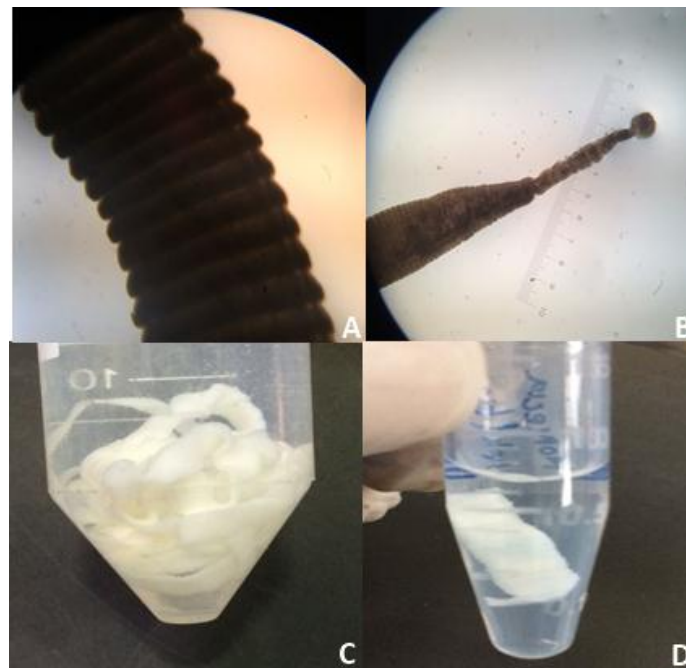


Figura 12. Parásito adulto de cestodo “*Moniezia spp*”. (A) Proglotides anchas y cortas donde se encuentran los huevos. (B) Escólex cubierto por ventosas. (C) Parásito adulto de *Moniezia spp*. (D) Fragmento de proglotides. Fotos tomadas por el Doctor Jimmy Vargas.

Se obtuvo materia fecal del recto de ovinos pertenecientes al centro agropecuario Marengo (Figura 13 A y B) y se procesó mediante técnica de Mc Master (Figura 13 C, D y E) donde se observa la presencia de huevos de nematodos. Las muestras positivas se reunieron para formar un pool (Figura 13 F) que fue incubado. Por último, se aislaron las larvas (Figura 13 G y H) visualizadas en la Figura 14.

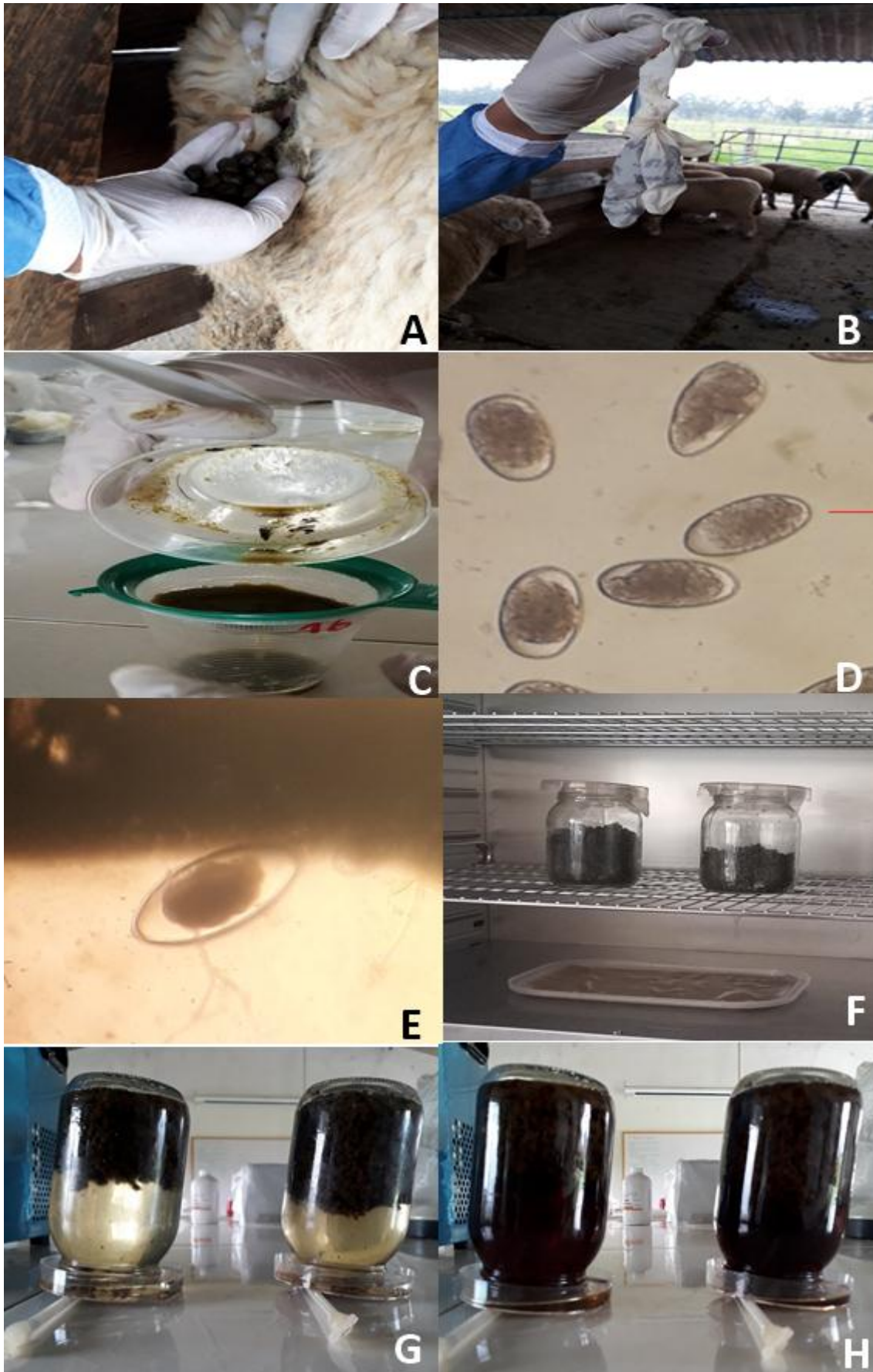


Figura 13. Procesamiento de materia fecal de ovejas de marengo. Fotos tomadas por Jair Gómez.

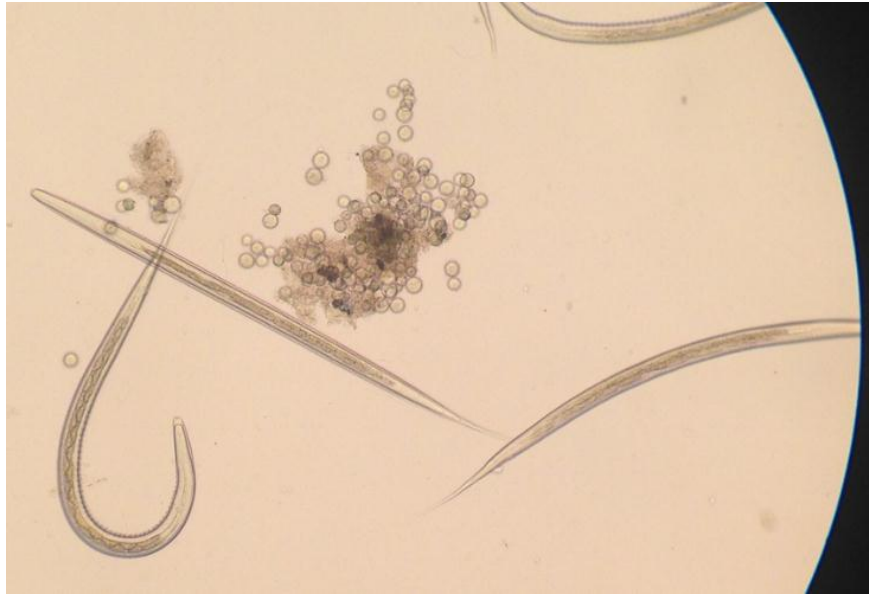


Figura 14. Larvas obtenidas a través de eclosión de huevos de materia fecal de ovinos presentes en marengo infectados con nematodos. Foto tomada por el Doctor Jimmy Vargas.

Las muestras de materia fecal procedentes de Concepción Santander (Figura 15) se registraron con los datos suministrados en el marcaje y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

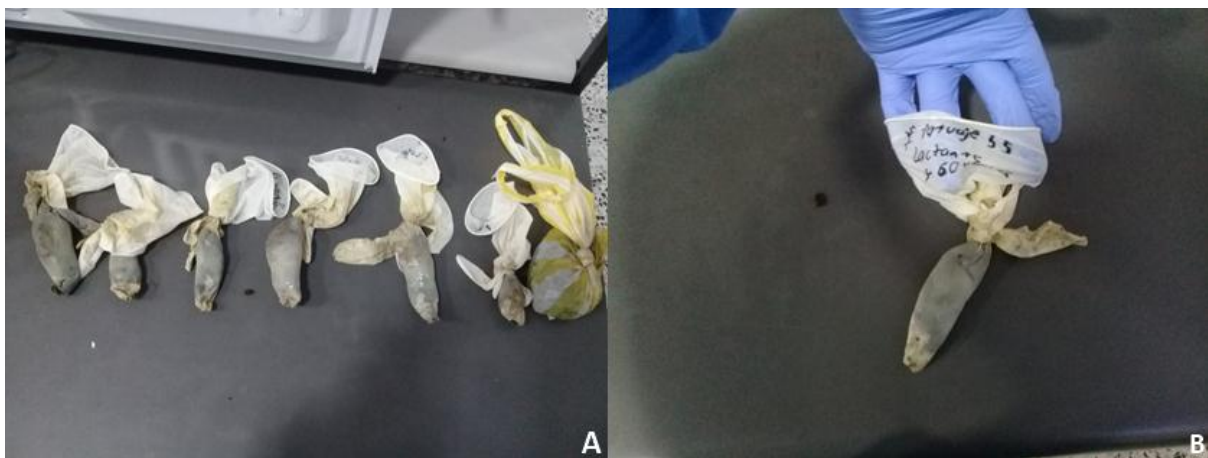


Figura 15. Muestras de materia fecal recolectadas de concepción Santander. (A) muestras previamente ordenadas. (B) marcaje realizado en cada una de las muestras. Fuente: Elaboración propia.

Fase 2. Extracción de ADN de parásitos adultos de trematodos, nematodos, cestodos, y pool de larvas para pruebas con el marcador mitocondrial COX-1

La extracción de ADN fue realizada con la técnica de fenol cloroformo, arrojando concentraciones de ADN que fueron leídas en Nanodrop 2000 y registradas en la tabla 1. A las muestras de *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum spp* se les realizaron diluciones 1:20 debido a la gran concentración de ADN.

Tabla 1. Cuantificación de ADN obtenido mediante técnica de fenol cloroformo y leídas usando el Nanodrop.

PARÁSITO	[] DE ADN	DIL 1:20
Fasciola hepática	173.4 ng/ μ l	10.2 ng/ μ L
Paramphistomum spp	481.9 ng/ μ L	27 ng/ μ L
Haemonchus contortus	18.2 ng/ μ L	-
Moniezia spp	14.6 ng/ μ L	-
Larvas intestinales	20.9 ng/ μ L	-

EL producto amplificado de la PCR de las muestras de parásitos adultos de trematodos, nematodos, cestodos y pool de larvas se corrió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, en este gel se comprueba la amplificación del gen COX-I en muestras de trematodos usando primers dirigidos a este marcador mitocondrial (Figura 16) podemos observar la amplificación en los primeros pozos (2-5) donde correspondieron a muestras de trematodos y la no amplificación en los (pozos 6-11) que correspondía a nematodos, cestodos y larvas intestinales.

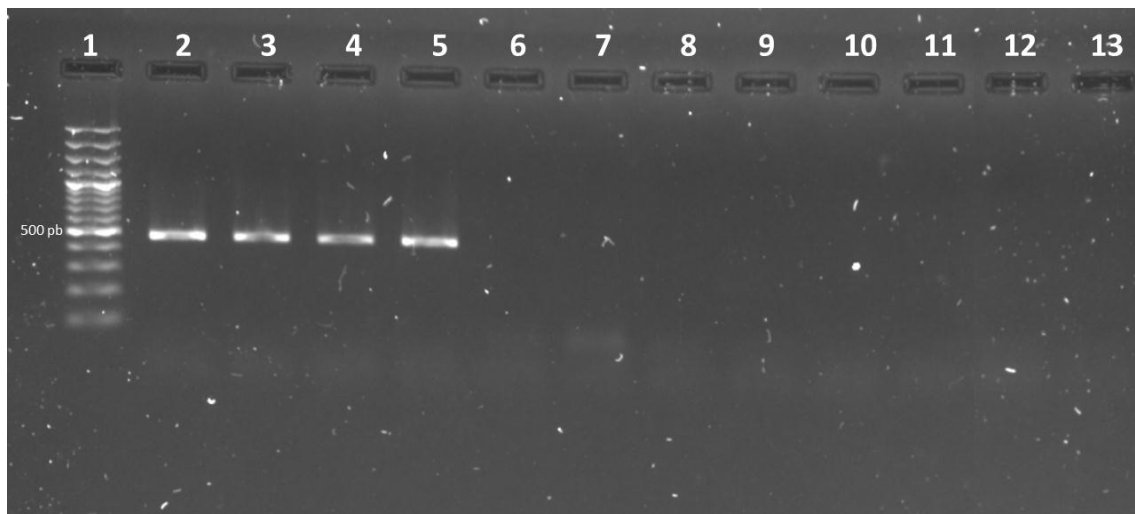


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del marcador mitocondrial COX-1 por parte de los primers paramcox1 en ADN de parásitos adultos. Pozo 1 marcador de peso molecular, Pozos 2 y 3 muestra de *Fasciola hepatica*, Pozos 4 y 5 muestra de *Paramphistomum* spp, Pozos 6 y 7 muestra de *Haemonchus contortus*, Pozos 8 y 9 muestra de *Moniezia* spp, Pozos 10 y 11 pool de larvas intestinales y Pozos 12 y 13 control negativo. Fuente: Elaboración propia.

Las bandas positivas para amplificación de ADN (pozos 2 y 4) en el gel de agarosa se les realiza purificación con kit comercial Zymo, se cuantificaron en el Nanodrop 2000 almacenando los datos en la tabla 2, y posterior a eso se enviaron al servicio de secuenciación.

Tabla 2. Cuantificación del ADN presente en las bandas purificadas correspondientes a las muestras de *Fasciola hepatica* (pozo 2) y *Paramphistomum* spp (pozo 4).

BANDA	[] DE ADN
Pozo 2	14.7 ng/ μ L
Pozo 4	18.1 ng/ μ L

Se recibieron las secuencias cuantificadas en el servicio de secuenciación, se visualizaron usando Bioedit mostrando que el resultado del pozo 2 contenía un fragmento de 448pb (figura 17 y 18) y pozo 4 un fragmento de 451pb (figura 20 y21), se compararon las secuencias en el GenBank usando BLAST, observando que la secuencia perteneciente al pozo 2 tiene una identidad del 99% a *Fasciola hepática* (figura 19) mientras que la secuencia perteneciente al pozo 4 tan solo tiene una identidad del 87% con *Paramphistomum cervi* (figura 22) y una identidad del 88% con *Calicophoron microbothrioides* (figura 23) parásito que también pertenece al grupo de los paramfistómidos identificados como agentes causales de paramfistomosis.

```
GCCAAAAAATGTATCATGAAGCAAGTATCCAAAAGAGAAGGCAGAAAGCATA
ATACCAGTAACCCACCAATAGTAAATAAAACAATAAACCCCTATAATTCACCACA
CAACAGGATCCCATATACGAACAGAACTACCCCCCCCCAACATTATCAACCAG
GAAAAGACCTTAATACCCGTAGGAATACCAATAACCATAGTAACAGAACTAAA
AAAAACAGCAGTATGCACATCCAAACCCACCATAAACATATGATGAGCCCAAA
CAACACTACCTAAACATACTATAGCAGCCATAGCTAAAATAAGACCATAATAACC
AAACAAAGAATCATTATTAGTTAGAGTCACACAAATATGACTAATAACCCCAAA
CCCGGGTAAAATCAAACATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAACCAAAACAAA
TGCTGAAACAACACAGGATCA
```

Figura 17. Secuencia obtenida de la purificación del pozo 2 obteniendo 448pb..


```

AACAAATCCAGGGTAATCATTGCAACCATAAGAATCTAATACACAAGAAGATAAC
ACTATACCGGTTACACCACCCATAGTAAACAACACAATAAAACCCATAATTCATCA
CACAACAGGATCCCAAACACGAATACCAGCACCCTCGACATATATAATCAAGAA
AACACCTTTATACCCGTCGGGATACCTATAACCATAGTCACAGAACTAAAAAATAC
AGATGTCTTCACATCTTAACCCACCATAAACATATGATGTGCCCAAACAACACCAC
CCAAACAAACTATAGAAGCCATAGCAAACACTAAACCATAATAACCAAACAACG
AATCTTGATTCTTATTCTCATACAAATATGACTTACAGCCCCAAAACCAGGTAAA
ATCAACACATATACCTCGGGATGTCCGAAAAATCAAATAAATGCTGAAACAAAA
CAGGATCA

```

Figura 20. Secuencia obtenida de la purificación del pozo 4 obteniendo 451pb.

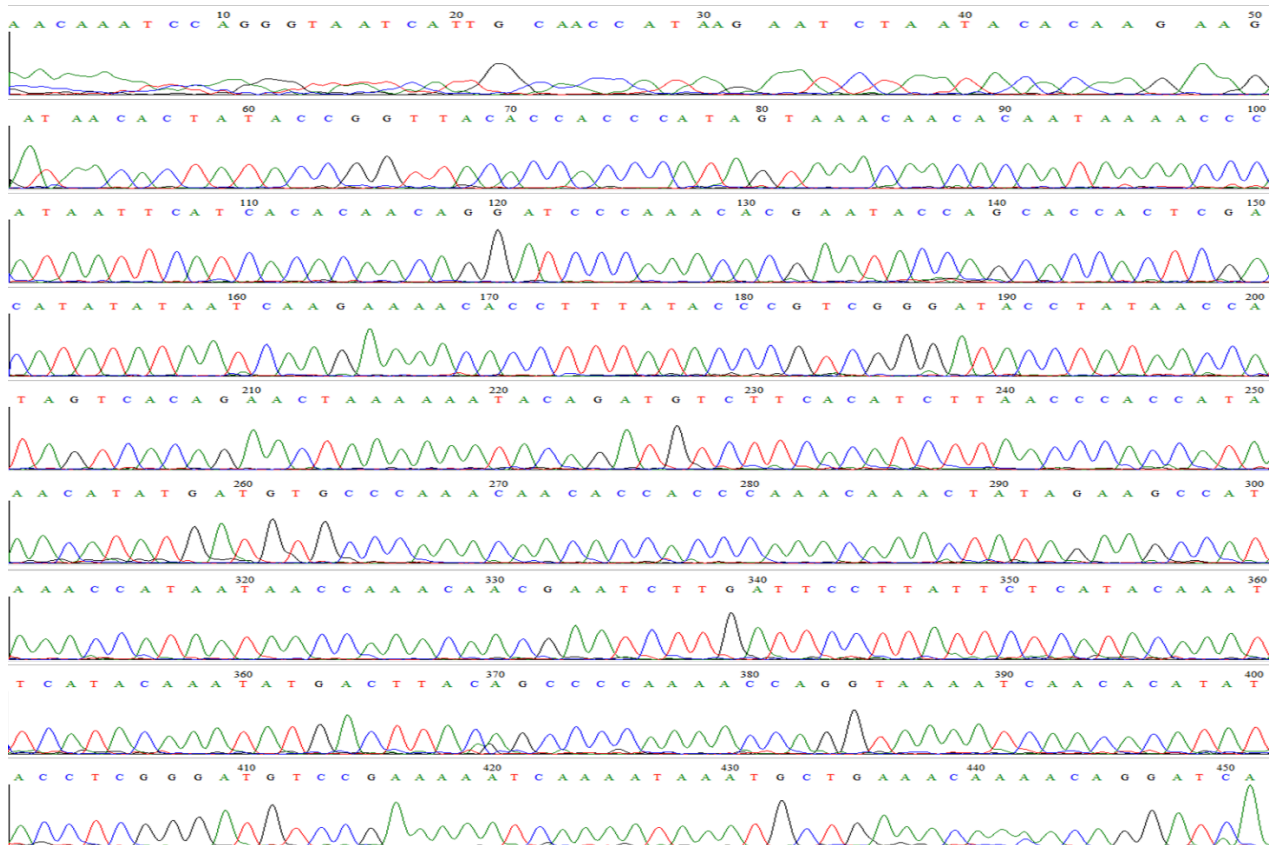


Figura 21. Visualización de la secuencia correspondiente a purificación del pozo 4 usando programa Bioedit.

Download ▾ GenBank Graphics

Paramphistomum cervi mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [gi|924859573|KT198987.1](#) Length: 14023 Number of Matches: 1

Range 1: 7590 to 8015 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
524 bits(580)	2e-146	373/427(87%)	1/427(0%)	Plus/Minus
Query 25	ACCATAAGAATCTAATACACAAGAAGATAA	CACTATAACCGTTACACCACCCATAGTAAA		84
Sbjct 8015	ACCATA-GAATCTAATACACAAGAACAATACTATCCAGTTACACCACCAATAGTAAA			7957
Query 85	CAACACAATAAAACCATAAATTCATCACACAACAGGATCCCAAACACGAATACCAGCACC			144
Sbjct 7956	TAAAACTATAAAACCATAAATTCACCATACAACAGGATCCCAAATACGAACCCTCGTACC			7897
Query 145	ACTCGACATATATAATCAAGAAAACACCTTTATACCCGTCGGGATACCTATAACCATAGT			204
Sbjct 7896	ACTCAACATATACAACCAGAAAACACCTTAATACCTGTAGGTATACCTATTACCATCGT			7837
Query 205	CACAGAACTAAAAATACAGATGTCTTCACATCTTAACCCACCATAAACATATGATGTGC			264
Sbjct 7836	TACAGACCTAAAAATACGGACGTCTTAACATCCAACCCTACCATAAACATATGATGAGC			7777
Query 265	CCAAACAACACCACCCAAACAACCTATAGAAGCCATAGCAAACACTAAACCATAATAACC			324
Sbjct 7776	CCAAACAACACTACCCAAACAACAATAGATGCCATAGCAAACACCAACCATAATAACC			7717
Query 325	AAACAACGAATCTTGATTCTTATTCTCATACAAATATGACTTACAGCCCAAAACCAGG			384
Sbjct 7716	AAACAACGAATCTTGATTCTTAACTCATACAAATATGACTAACAAACCCGAAACCCGG			7657
Query 385	TAAAAATCAACACATATACTCGGGATGTCCGAAAATCAAATAAATGCTGAAACAAAAC			444
Sbjct 7656	CAAAATCAACACATAAACCTCAGGGTGCCCAAAAACCAAATAAATGCTGAAACAAAAC			7597
Query 445	AGGATCA	451		
Sbjct 7596	AGGATCA	7590		

Figura 22. Comparación A de la secuencia de ADN obtenida de la purificación del pozo 4 con las secuencias presentes en el GenBank usando BLAST.

Download ▾ GenBank Graphics

Calicophoron microbothrioides mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [gi|827502471|KR337555.1](#) Length: 14028 Number of Matches: 1

Range 1: 7637 to 8062 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
536 bits(594)	4e-150	376/427(88%)	1/427(0%)	Plus/Minus
Query 25	ACCATAAGAATCTAATACACAAGARGATAA	CACTATAACCGTTACACCACCCATAGTAAA		84
Sbjct 8062	ACCATA-GAATCTAACACACAGGACGATAA	CACTATAACCGTTAACACCCCTATAGTAAA		8004
Query 85	CAACACAATAAAACCATAAATTCATCACACAACAGGATCCCAAACACGAATACCAGCACC			144
Sbjct 8003	CAATACAATAAAACCATAAATTCACCACACAACAGGATCTCAAACACGAACACCCGTACC			7944
Query 145	ACTCGACATATATAATCAAGAAAACACCTTTATACCCGTCGGGATACCTATAACCATAGT			204
Sbjct 7943	ACTTAACATATACAACCAGAAAATACCTTAATTCCTGGTATACCTATTACCATCGA			7884
Query 205	CACAGAACTAAAAATACAGATGTCTTCACATCTTAACCCACCATAAACATATGATGTGC			264
Sbjct 7883	CACAGACCTAAAAAACACAGATGTCTTCACATCTAAACCACCATAAACATATGATGAGC			7824
Query 265	CCAAACAACACCACCCAAACAACCTATAGAAGCCATAGCAAACACTAAACCATAATAACC			324
Sbjct 7823	CCACACCACACTACCCAAACAGACAATAGAAGCCATAGCAAATACTAAACCATAATAACC			7764
Query 325	AAACAACGAATCTTGATTCTTATTCTCATACAAATATGACTTACAGCCCAAAACCAGG			384
Sbjct 7763	AAATAACGAATCTTGATTCTTAACTCATACAAATATGCCTCACAGCACCAGAAACCAGG			7704
Query 385	TAAAAATCAACACATATACTCGGGATGTCCGAAAATCAAATAAATGCTGAAACAAAAC			444
Sbjct 7703	CAAAATCAACACATAAACCTCAGGATGACCAAAAACCAAATAAATGCTGAAACAAGAC			7644
Query 445	AGGATCA	451		
Sbjct 7643	AGGATCA	7637		

Figura 23. Comparación B de la secuencia de ADN obtenida de la purificación del pozo 4 con las secuencias presentes en el GenBank usando BLAST..

Fase 3: Prueba de los primers ParamCOX1 forward y reverse en muestras de materia fecal obtenidas en Concepción Santander

La técnica de sedimentación rápida modificada fue usada para identificación de huevos de trematodos y realizada en 10 muestras obtenidas de animales presuntamente infectados ubicados en concepción Santander (figura 24), mediante esta técnica únicamente 4 muestras (40%) mostraron un resultado positivo (muestras 2,4,5 y 7); usando como criterio de positividad la presencia de al menos un huevo correspondiente a algún trematodo (Figura 25). Los resultados se registraron en la tabla 3.

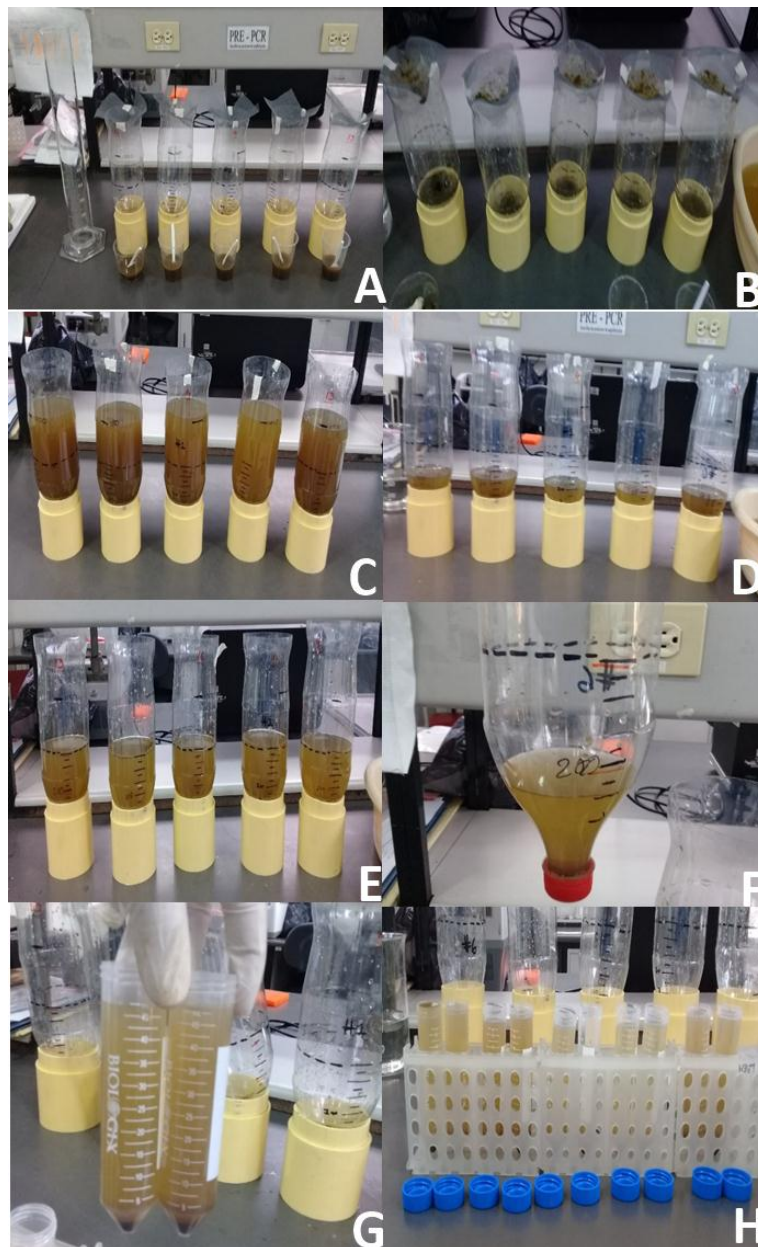


Figura 24. Técnica de sedimentación rápida modificada paso a paso: (A-E) elución de la muestra (F-H) concentración de los huevos. Fuente: Elaboración propia.

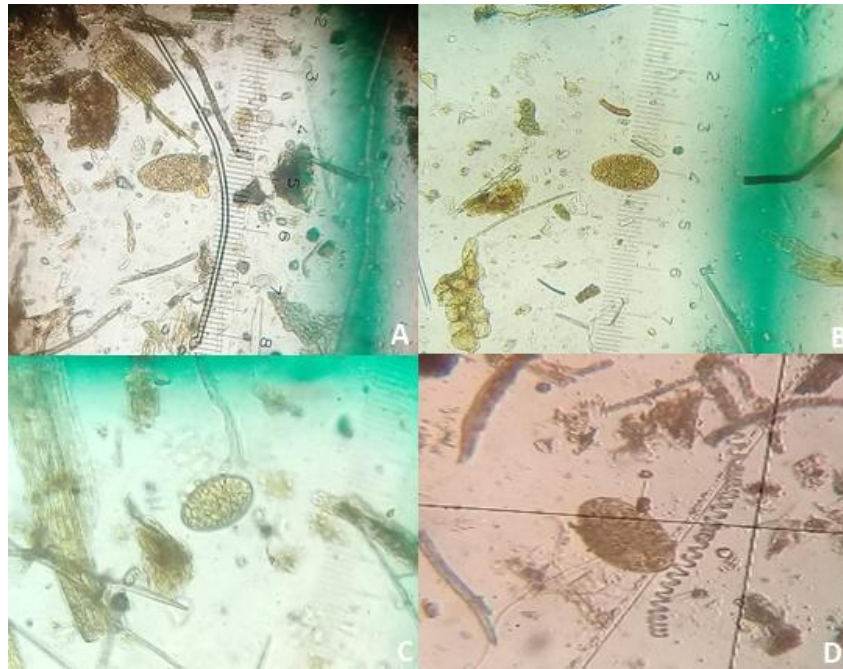


Figura 25. Huevos de trematodos en muestras de materia fecal positivas por técnica de sedimentación rápida modificada. (A) muestra 2, (B) muestra 4, (C) muestra 5, (D) muestra 7. Fuente: Elaboración propia.

Las muestras analizadas por sedimentación rápida modificada se analizaron por técnica de Mc Master (Figura 26) identificando nematodos en 9 muestras (90%) (Figura 27) y cestodos en 1 muestra (10%), los datos fueron consignados en la Tabla 3 donde además se observan los datos de marcaje al momento de la llegada de la muestra, el tatuaje del animal, la edad y su condición fisiológica.

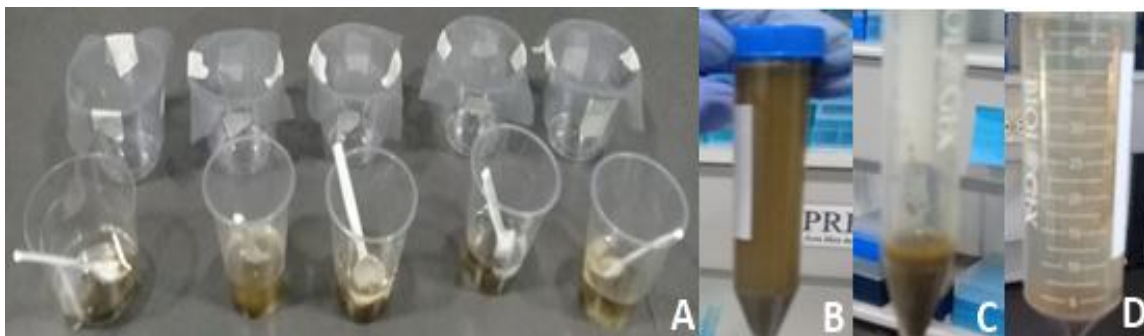


Figura 26. Técnica de Mc Master paso a paso. (A-C) concentración de las muestras. (B) flotación de los huevos con solución de Mc Master. Fuente: Elaboración propia.

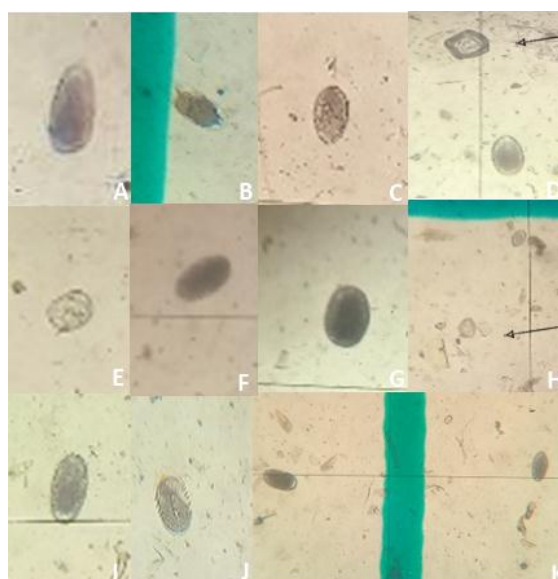


Figura 27. Huevos de nematodos y cestodos en muestras positivas mediante técnica de Mc Master. (A-K) huevos de nematodos. (D y H) presencia de huevos de nematodos y huevos de cestodos (huevos de cestodos seleccionados con flecha). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Datos de las muestras recolectadas de animales que cumplen con las condiciones de infección por trematodos. HT: presencia de huevos de trematodos, HN: presencia de huevos de nematodos, HC: presencia de huevos de cestodos.

#	DATOS	HT	HN	HC
1	Tatuaje 22, preñada de 36 meses	negativo	positivo	negativo
2	Tatuaje 07, preñada de 60 meses	positivo	positivo	negativo
3	Tatuaje 55, lactante de 60 meses	negativo	positivo	negativo
4	Tatuaje 22, lactante de 60 meses	positivo	positivo	negativo
5	Tatuaje 25, hembra de 9 meses	positivo	positivo	negativo
6	Tatuaje 27, lactante de 48 meses	negativo	positivo	negativo
7	Tatuaje 0835, vacía de 8 meses	positivo	positivo	positivo
8	Tatuaje 03, lactante de 48 meses	negativo	negativo	negativo
9	Tatuaje 16, preñada de 25 meses	negativo	positivo	negativo
10	Tatuaje 05, preñada de 50 meses	negativo	positivo	negativo

Las muestras de ADN procedentes de materia fecal se cuantificaron en Nanodrop 2000. En la tabla 4 se consignan los valores de la cuantificación de las muestras extraídas usando el Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit y las muestras extraídas usando la técnica de fenol cloroformo.

Tabla 4. Concentraciones de ADN cuantificadas en el Nanodrop correspondiente a muestras extraídas con el Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit y las muestras extraídas con fenol cloroformo.

Muestra	[] DE ADN	Muestra	[] DE ADN
2	10.4 ng/μl	6A	266.7 ng/μL
4	10.6 ng/μL	6B	260.8 ng/μL
5	9.7 ng/μL	7A	399.1 ng/μL
7	28.6 ng/μL	7B	135 ng/μL
		8A	266.7 ng/μL
		8B	281.4 ng/μL
		9A	350.4 ng/μL
		9B	368.6 ng/μL
		10A	464.7 ng/μL
		10B	473.6ng/μL

Las muestras de ADN que son extraídas usando la técnica de fenol cloroformo y el Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit, son amplificadas mediante PCR y posteriormente visualizadas en gel de agarosa al 1.5% (Figura 28). Se observa que solo se dio una amplificación de los parásitos adultos ubicados en los pozos 2 y 3 usados como control positivo.

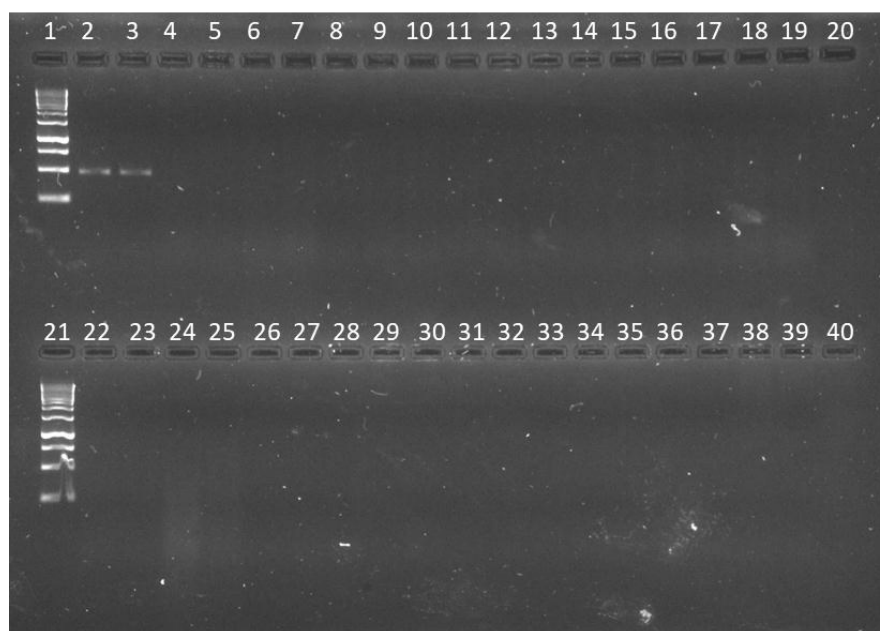


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de las muestras de materia fecal extraídas con fenol cloroformo y minikit de QIAamp y amplificadas con los Primers ParamCOX I F y R. Pozos 1 y 21 se ubica el marcador de peso molecular, Pozo 2 control positivo de *Fasciola hepatica*, pozo 3 control positivo de *Paramphistomum* spp, Pozos 4-24 muestras extraídas con fenol cloroformo, Pozos 25-28 muestras extraídas usando QIAamp DNA Mini Kit, Pozos 29-30 controles negativos. Fuente: Elaboración propia.

Se decide tomar una muestra al azar de los extraídos con QIAamp DNA Mini Kit, se diluyo 1:10, 1:20 y 1:50, a continuación, se realizó PCR y visualización del gel de agarosa al 1.5% (Figura 29); al igual que en la corrida electroforética anterior solo se

observa amplificación en los controles positivos y no se observa resultado positivo en ninguna de las diluciones.

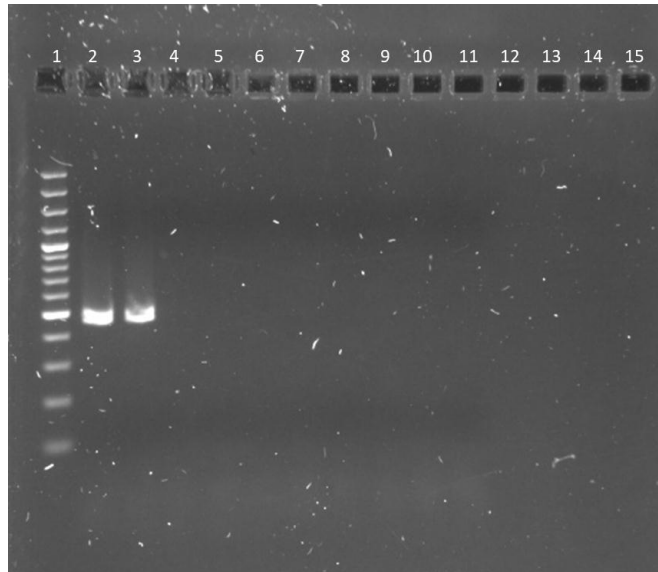


Figura 29. Electroforesis de muestra al azar y sus respectivas diluciones 1:10, 1:20 y 1:50. Pozo 1 Patrón de peso molecular, Pozo 2 control positivo de *Fasciola hepatica*, pozo 3 control positivo de *Paramphistomum* spp. Pozo 4 Dilución 1:10, Pozo 5 dilución 1:20 y Pozo 6 Dilución 1:50 diluciones de la muestra tomada al azar, Pozo 7 control negativo. Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron diluciones 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 del ADN del pool de muestras positivas de materia fecal previamente secadas en horno, estas se montaron por duplicado clasificándolas en Muestra 1 y Muestra 2 (Figura 30), El producto de los amplificados se corrió por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 31) observando únicamente amplificación de los controles ubicados en los pozos 2 y 3.



Figura 30. Pool de muestra de materia fecal secada en horno. Fuente: Elaboración propia.

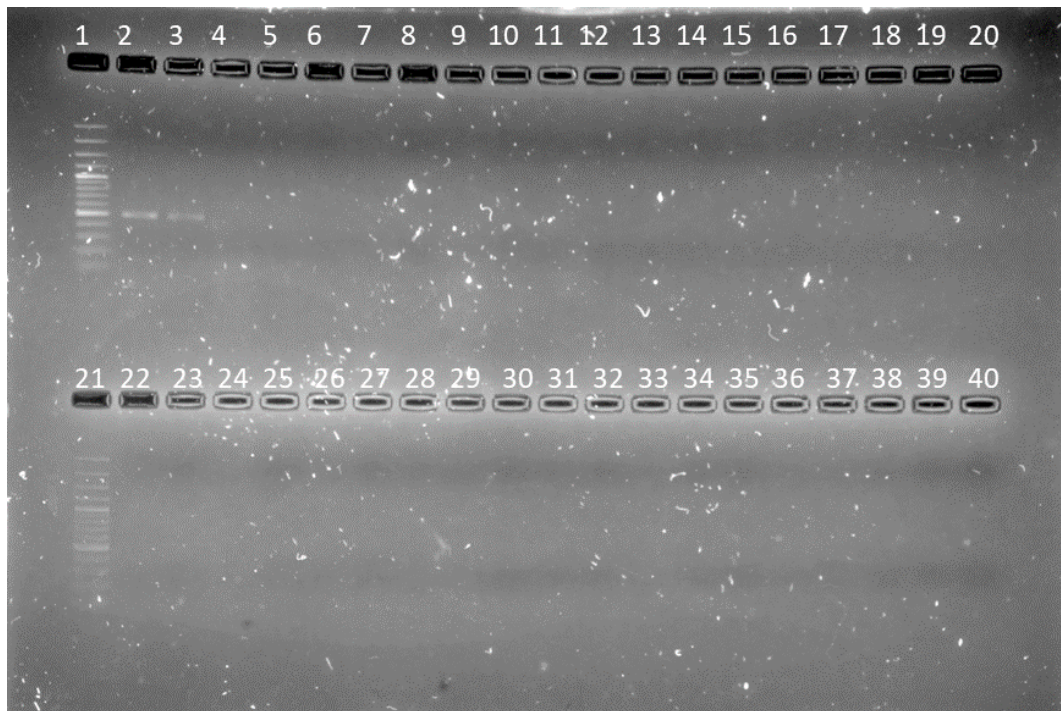


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con pool de muestras positivas de materia fecal secadas previamente en horno. Pozos 1 y 21 Patrón de peso molecular, Pozo 2 control positivo de *Fasciola hepatica*, pozo 3 control positivo de *Paramphistomum* spp, Muestra 1 Pool de materia fecal extraído con fenol-cloroformo Pozo 4 Muestra pura, Pozo 5 Dilución 1:20, Pozo 6 Dilución 1:50, Pozo 7 Dilución 1:100 y Pozo 8 Dilución 1:200, Muestra 2 Pool de materia fecal extraído con fenol-cloroformo Pozo 9 Muestra pura, Pozo 10 dilución 1:20, Pozo 11 Dilución 1:50, Pozo 12 Dilución 1:100 y Pozo 13 Dilución 1:200, Muestra 1 Pool de materia fecal extraído con kit Pozo 14 Muestra pura, Pozo 15 Dilución 1:20, Pozo 16 Dilución 1:50, Pozo 17 Dilución 1:100 y Pozo 18 Dilución 1:200, Muestra 1 extraída con kit diluida 1:2 antes del proceso de digestión Pozo 19 muestra pura, Pozo 20 Dilución 1:20, Pozo 22 Dilución 1:50, Pozo 23 Dilución 1:100 y Pozo 24 Dilución 1:200, Muestra 2 extraída con kit Pozo 25 muestra pura, Pozo 26 Dilución 1:20, Pozo 27 Dilución 1:50, Pozo 28 Dilución 1:100 y Pozo 29 Dilución 1:200. Muestra 2 extraída con kit y diluida 1:2 antes del proceso de digestión Pozo 30 muestra pura, Pozo 31 Dilución 1:20, Pozo 32 Dilución 1:50, Pozo 33 Dilución 1:100 y Pozo 34 Dilución 1:200, y Pozo 35 control negativo. Fuente: Elaboración propia.

Se realiza un nuevo ensayo de PCR (Figura 32) esta vez a partir de extracción de ADN de huevos obtenidos al revisar el pool de muestras usando cámara de Mc Master y recuperados mediante aspiración del contenido con pipeta Pasteur; sin embargo, a pesar de aumentar la concentración de huevos solo se observa la amplificación de los controles positivos ubicados en el pozo 2 y 3.

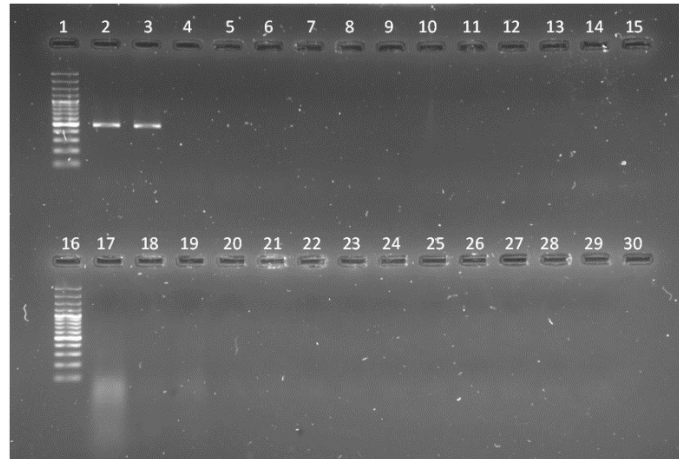


Figura 32. Electroforesis de los productos amplificados del ADN de huevos obtenidos al revisar el pool de muestras usando cámara de Mc Master y recuperados con ayuda de pipeta Pasteur corridos con los primers ParamCOX I F y R. Pozos 1 y 16 Patrón de peso molecular, Pozo 2 control positivo de *Fasciola hepatica*, pozo 3 control positivo de *Paramphistomum* spp. Pozos 4 muestra pura, Pozo 5 Dilución 1:20, Pozo 6 Muestra pura, Pozo 7 Dilución 1:20, Pozo 8 muestra pura, Pozo 9 Dilución 1:20, Pozo 10 muestra pura, Pozo 11 Dilución 1:20, Pozo 12 muestra pura, Pozo 13 Dilución 1:20, Pozo 14 muestra pura, Pozo 15 Dilución 1:20, Pozo 17 muestra pura, Pozo 18 Dilución 1:20, Pozo 19 muestra pura, Pozo 20 Dilución 1:20 y Pozo 21 control negativo. Fuente: Elaboración propia.

Por último, se realiza PCR esta vez usando muestras de ADN procedentes del pool de materia fecal con ayuda de los kits comerciales ZR Plant/Seed DNA Kit™ y ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit, el primero especializado en romper las duras membranas presentes en plantas y el otro en recuperar ADN de muestras difíciles. Se observó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se encontró la amplificación únicamente de los controles positivos ubicados en los pozos 2 y 3, el kit especializado en plantas se ubicó en los pozos 4 y 5 mientras que el usado para muestras difíciles se ubicó en los pozos 6 y 7 (Figura 33)

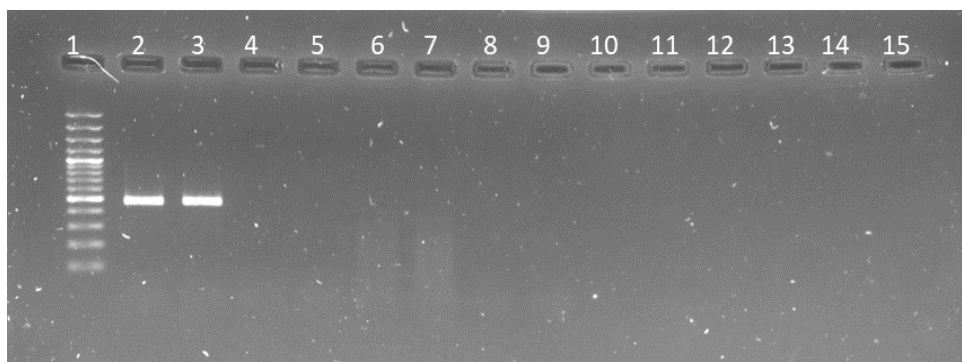


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del producto amplificado de las muestras de ADN extraídas con los kits comerciales ZR Plant/Seed DNA Kit™ y ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit. Pozos 1 Patrón de peso molecular, Pozo 2 control positivo de *Fasciola hepatica*, pozo 3 control positivo de *Paramphistomum* spp. Pozos 4 y 5 kit especializado en plantas y Pozos 6 y 7 kit especializados en muestras de difícil extracción y Pozos 8 y 9 controles negativos. Fuente: Elaboración propia.

8. DISCUSIÓN

Los trematodos son parásitos que constituyen uno de los grupos más grandes del reino animalia, cuentan con gran distribución a nivel mundial afectando tanto vertebrados como invertebrados ⁽¹⁾. Los rumiantes son los animales más afectados por los trematodos, con dos familias de gran importancia *Paramphistomidae* ⁽²⁶⁾ y *Fasciolidae* ⁽²⁷⁾, como causantes de esta infección.

Las paramfistomidosis y fasciolosis son parasitosis frecuentes; a nivel mundial se destaca la fasciolosis como una enfermedad de carácter zoonótico y de gran importancia en salud pública; por el contrario, la paramfistomidosis cuenta con pocos estudios; sin embargo, en los últimos años y se ha demostrado que la prevalencia de esta parasitosis ha aumentado significativamente ⁽⁴⁵⁾.

Un aspecto importante radica en que según la OMS se estima que 2,4 millones de personas están infectadas por *Fasciola hepática*, y que 180 millones más están en riesgo de infección, más de 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos en todo el mundo son afectados por esta enfermedad. las pérdidas económicas mundiales por fasciolosis son de 3,2 millones de dólares al año y las pérdidas reportadas en Colombia muestran valores de \$12.483 millones de pesos ⁽²⁰⁾. En Colombia, la infección por *Fasciola hepática* tiene una prevalencia de 20% a 25% en Bovinos dedicados a la industria lechera situados en climas fríos y ubicados en Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Norte de Santander ⁽²⁰⁾.

El diagnóstico clínico de estas parasitosis depende de los signos y síntomas clínicos presentados por el animal como: Hemorragias, pérdida de peso, abortos a repetición, diarrea y picos febriles, lo que conlleva al clínico a sospechar de la enfermedad. El método más común empleado en el laboratorio para un diagnóstico certero es la visualización de huevos presentes en materia fecal, que, aunque son de gran utilidad no permiten la precisa diferenciación del trematodo causante de la infección.

Para animales sacrificados, la necropsia en campo se usa como complemento del diagnóstico clínico, mediante la observación de múltiples heridas desarrolladas por la migración de los parásitos a través del intestino ⁽³¹⁾. Esta se consolida como una prueba estándar, ya que permite su identificación rápida y la observación de las lesiones producidas por estos parásitos ⁽⁶¹⁾.

El resultado obtenido en este trabajo muestra la utilidad de la técnica pues se obtuvieron parásitos de rumiantes procedentes de Nobsa, Boyacá, correspondientes a *Fasciola hepática*. Lo que además concuerda con reportes de presencia del parásito en bovinos sacrificados en plantas de beneficio en Sutamarchán ⁽⁶²⁾ y Chivata ⁽⁶³⁾ municipios pertenecientes a Boyacá.

También, se extrajo *Paramphistomum* spp. en Villavicencio Meta por necropsia en campo de bovinos que presentaban infección en el rumen. La identificación fue realizada por características morfológicas, Se cuenta con reportes similares en la zona ⁽⁶⁾ aunque estudios anteriores reportan la presencia de la esta familia de digeneos en Antioquia ⁽³⁾ ⁽²³⁾.

La diferenciación entre especies se ha dado por la clasificación fenotípica pero ya se ha comprobado que esta no es fiable para la diferenciación específica entre ellas debido a la variación de tamaño en el estadio adulto. La necesidad de diferenciación ha impulsado una serie de técnicas moleculares que han ayudado a dar mayor especificidad entre especies. las técnicas más utilizadas son los marcadores ribosomales nucleares (ITS-1 y 2) y los marcadores mitocondriales (COX 1 Y NAD) ⁽¹⁵⁾ ⁽⁴⁵⁾.

Las técnicas moleculares en los últimos años han permitido caracterizar los genomas de diferentes parásitos identificando marcadores específicos los cuales permiten una clasificación entre especies ⁽¹⁴⁾. El uso diagnóstico de la biología molecular ha confirmado por PCR la presencia de *F. hepatica* en caracoles de diferentes especies, pero en Paramfistómidos aún es muy limitado ⁽⁴⁵⁾.

La caracterización genética es un parámetro que ha permitido la identificación y caracterización de fasciola a nivel mundial. Estas técnicas tienen una gran importancia taxonómica y epidemiológica. Se ha encontrado, además, que COX 1 en los últimos años ha permitido aclarar origen y posible fuente de infección en la fasciolosis ⁽⁶⁴⁾; es por ello que, en base a este marcador universal, se creó el consorcio internacional conocido como código de barras de vida a nivel universal específico de cada especie, pues permite la identificación de haplotipos entre especie, siendo usado en investigaciones filogenéticas, reconstrucción demográfica y diversificación adaptativa ⁽¹⁷⁾. hay también mucho interés en encontrar marcadores genéticos para caracterización de las especies y cepas de Lymneidos como hospedadores vectores en la transmisión de la fasciolosis ⁽¹⁷⁾.

Entre la mitocondria se destacan dos marcadores COX y NAD que son los marcadores más utilizados para la identificación de este genoma, estos poseen herencia uniparental y son usados para estudios poblacionales por presentar un amplio polimorfismo intra e inter específico además de su capacidad para evolucionar a mayor velocidad el ADN mitocondrial. Citocromo oxidasa b, citocromo oxidasa 1, NAD deshidrogenasa 1 y 4, en conjunto representan solo el 13% de la diversidad de genes de la molécula mitocondrial ⁽¹⁷⁾ ⁽⁶⁵⁾.

Los marcadores ribosomales ITS 1 y 2 permiten identificar las diferentes especies de fasciola, permitiendo una separación filogenética entre *F. hepatica* y *F. gigantica*, este tipo de diferenciaciones a veces son difíciles por técnicas micro y macroscópicas ⁽⁶⁵⁾. Estudios realizados por Itagaki usando el marcador mitocondrial COX 1 en muestras

del *Fasciola* spp. comprueban que las secuencias obtenidas se relacionan con el ancestro materno mostrando alto grado de conservación ⁽²⁵⁾. El análisis de secuencias usando el marcado ribosomal ITS ha permitido identificar la homología entre especies de *Fasciola* comprobando la presencia de diferentes haplotipos en comparación con parásitos descritos en otros lugares ⁽²⁵⁾.

En este estudio encontramos secuencias de 448pb correspondientes a *F. hepatica* y a 451pb una secuencia homóloga con 2 tipos de parásitos pertenecientes al grupo de los paramfistómidos. Resultados similares fueron encontrados por Moazeni y col. en un estudio en donde se obtuvieron productos de PCR que al ser secuenciados arrojaron dos productos 493pb mostrando diferentes haplotipos de *F. hepatica* ⁽⁶⁴⁾, otros resultados obtenidos por Martin muestra fragmentos de 399pb correspondientes a *F. hepatica* ⁽¹⁷⁾.

los resultados obtenidos fueron comparados en el GenBank, obteniendo como resultado la secuencia de 448pb una identidad con *F. hepatica* del 99% a diferencia del fragmento de 451pb en donde se encontró una identidad del 87% con *Paramphistomum cervi* y 88% con *Calicophoron microbothrioides* parásito que también pertenece al grupo de los paramfistómidos identificados como agentes causales de paramfistomosis.

Otra técnica útil para el diagnóstico y diferenciación de estos parásitos es la detección de polimorfismo utilizando la PCR. En la cual se usa únicamente un cebador corto y de secuencia arbitraria y en el momento de la amplificación es usado ciclos a baja temperatura asegurando que el fragmento sea amplificado en donde generalmente se observa un patrón motivando característico de los individuos analizados, y, en caso de polimorfismo se verá un fallo en la amplificación del fragmento produciendo una variación en la banda de cada individuo ocasionando fragmentos de tamaño diferencial ⁽¹⁷⁾.

Este estudio además realizó la identificación del parásito en muestras fecales facilitando la observación de huevos por técnica de sedimentación rápida modificada, la cual arrojó un total de 4 (40%) de 10 muestras analizadas con presencia de huevos pertenecientes a la clase trematoda. El uso de este tipo muestra posee ventajas como su obtención sin necesidad de perturbar al animal y facilidad de transporte en etanol a temperatura ambiente ⁽⁶⁶⁾. Estudios muestran presencia de *Fasciola hepatica* y digeneos de la familia Paramphistomidae con positividad de 10% para presencia de *F. hepatica*, mientras que la familia de paramfistómidos el resultado fue de 28.4% muestras y un 7.4% con infecciones mixtas ⁽⁴⁰⁾.

Aunque se realizaron diferentes protocolos para la extracción de ADN y manejo de muestras para PCR procedentes de materia fecal positiva para presencia de trematodos no se logró amplificación alguna. Ayudadores como kits comerciales para el manejo de muestras difíciles, diluciones a las muestras usadas, secado en horno

de la materia fecal y toma de muestras al azar para corrida electroforética fueron herramientas inútiles para conseguir una visualización del producto de amplificación esperado. Se asume que la gran cantidad de sustancias inhibitoras presentes tanto en los reactivos usados para la extracción de ADN como las de materia fecal no permitieron la correcta amplificación de las muestras.

Una gran cantidad de sustancias de origen natural introducidas durante el mismo proceso de la PCR, así como solventes químicos utilizados en el laboratorio para los procesos de extracción de ADN, son reconocidas como inhibidores ⁽⁶⁶⁾; Aunque las heces son la fuente de ADN que se usa con mayor frecuencia el trabajo con este tipo de muestras tiene inconvenientes debido a que se encuentra acompañada de microorganismos, restos de comida no digeridos, enzimas digestivas, moco y sales biliares; lo cual puede limitar la aplicabilidad de este tipo de material para estudios moleculares pues presenta una baja eficacia en el proceso de amplificación ⁽⁵⁹⁾.

Los contaminantes que inhiben la amplificación de ácidos nucleicos en la PCR, tienen un modo de acción que se puede deber a la precipitación o a la desnaturalización del ADN o a la interacción con iones Mg^{2+} , impidiendo por tanto su unión con cualquier ADN polimerasa. además, estos compuestos inhibitorios pueden interferir a distintos niveles de la reacción, dando lugar a diferentes grados de atenuación, siendo el grado de inhibición final dependiente de su concentración ⁽⁶⁶⁾.

Con respecto a los detergentes iónicos, se describe en ellos un efecto más inhibitorio que los no iónicos y específicamente en el caso del SDS que al utilizarse en etapas iniciales en la extracción del ADN, las cantidades residuales son removidas en las etapas de lavado subsiguientes. misma situación ocurre con el acetato de sodio, al cual se le describe una disminución de su efecto inhibitorio posterior a la etapa de lavado con etanol 70% ⁽⁶⁶⁾. el etanol e isopropanol también son compuestos comunes utilizados para la extracción del ADN, aun teniéndose en cuenta su participación como sustancias inhibitorias. no obstante, se señala que ambos son removidos al secar el sedimento antes de la resuspensión en agua libre de nucleasas ⁽⁶⁶⁾.

La extracción de ADN es un paso crucial en el análisis genético utilizando muestras no invasivas, debido a que los pasos posteriores dependen de la concentración, la calidad, la pureza del ADN y la cantidad de inhibidores. Debido a esto en la última década se han utilizado métodos para la extracción de ADN fecal incluyendo: protocolo de fenol-cloroformo, perlas magnéticas y kits de extracción con sílice, disponibles comercialmente; sin embargo, no hay un consenso claro sobre el método óptimo, y lo que se ha tenido en cuenta es que el método óptimo puede variar según la especie y la región geográfica ^{(59) (67)}.

9. CONCLUSIONES

La utilización de primers degenerados permiten la correcta amplificación de más de una especie de parásito perteneciente a la misma clase, en este caso Trematoda, Sin embargo, la calidad o tipo de la muestra juega un papel importante cuando se desea hacer un diagnóstico diferencial. Pues, aunque la técnica de sedimentación rápida modificada muestra una buena sensibilidad para el diagnóstico no permite la diferenciación de las especies debido a la similitud de las características morfológicas del huevo; y, la necropsia en campo, aunque permite la diferenciación de las especies en su estadio adulto solo puede ser usada si se sacrifica el animal.

El genoma mitocondrial entonces, se presenta como una técnica útil y eficiente para el diagnóstico y diferenciación de las especies debido a que tiene regiones altamente conservadas que la hacen específicas para cada parásito pues se consideran el código de barras de la vida; sin embargo, su utilización hasta ahora está dada para las muestras de ADN procedentes del parásito.

Los inhibidores presentes tanto en la materia fecal como en los componentes usados en la extracción de ADN dificultan la correcta amplificación por acción inespecífica del ADN polimerasa dada por los iones Mg presentes en la muestra, o por la precipitación o desnaturalización del ADN, que impiden la correcta amplificación de la secuencia diana.

Las comparaciones de las secuencias obtenidas en el GenBank dejan en manifiesto la presencia de *F. hepatica* y Paranfistomidos como parásitos obtenidos por la necropsia en campo y como posibles causantes de infección en rumiantes de Nobsa, Boyacá y Villavicencio, Meta.

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere usar las secuencias obtenidas para la elaboración de primers específicos dirigidos a cada uno de los trematodos involucrados en el estudio, identificando cuál podría ser la región en la que se observa mayor conservación, debido a que los primers usados son degenerados y por ende expresan menor especificidad.

Los ensayos con caracoles (Hospederos intermediarios) permiten la obtención de una muestra con una menor cantidad de inhibidores que las obtenidas en la materia fecal, Además, la utilización de un kit para la extracción de ADN en materia fecal específico para la especie y región geográfica sería de gran ayuda para disminuir la presencia de inhibidores y así conseguir una precisa amplificación de las muestras.

Estudios posteriores se pueden centrar en la realización de árboles filogenéticos con el fin de comparar las secuencias obtenidas con secuencias ya identificadas en el GenBank que permitan establecer e identificar los parasitos presentes en Nobsa, Boyacá y Villavicencio Meta.

Se propone además la utilización de otros tipos de PCR con características más avanzadas, como una NESTED PCR que permite una amplificación más específica de la secuencia diana, generando así mejores resultados en muestras difíciles como la materia fecal.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de parásitos adultos en rumiantes sacrificados mediante necropsia en campo

1. Para la búsqueda de los parásitos se realiza la inspección en los siguientes órganos: *Fasciola hepatica* hígado y conductos biliares, Paramphistómidos rumen y para nematodos y cestodos el abomaso e intestinos
2. Para retirar el parásito adulto del órgano infectado es necesario el uso de guantes como método de barrera y de pinzas como herramienta de recolección.
3. El parásito extraído se lava con PBS para eliminar cualquier tipo de residuo.
4. Se deposita el parásito previamente lavado en un recipiente plástico marcado y con $\frac{3}{4}$ partes de etanol absoluto.
5. Se refrigeran a 4°C hasta su posterior análisis.

Anexo 2. Recolección de muestra de materia fecal

1. Las muestras se recolectaron por cada animal.
2. Se realizó cambio de guantes al terminar cada colecta de materia fecal con el fin de evitar la contaminación entre animales y entre muestras.
3. Se introducen de uno a dos dedos y se estimula la ampolla rectal con movimientos circulares.
4. La cantidad de muestra establecida por animal es de 40-60 gramos.
5. Se almacenan las muestras en el guante utilizado para recolección o en bolsas de polietileno.
6. Cada muestra se rotulada con el ID del animal y se refrigera a 4°C hasta procesamiento.

Anexo 3. Técnica de Mc Máster

1. Se toman de 2 a 5 gramos de materia fecal (por muestra).
2. Se pasa la cantidad de muestra analizar a un recipiente
3. Se adicionan 20 ml de agua destilada y se homogeniza hasta que la muestra quede debidamente re suspendida.
4. Filtrar en un colador y depositar en un vaso.
5. Trasferir a un falcón de 15ml la muestra homogenizada.
6. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.
7. Descartar el sobrenadante y resuspender con solución de Mc Master.
8. Agitar vigorosamente la muestra resuspendida con ayuda de un vórtex.
9. Dejar reposar por 5 minutos.
10. Transferir el sobrenadante con una pipeta Pasteur a una cámara de Mc Master con cuidado de no ir a dejar la cámara con burbujas o sin las condiciones óptimas de muestra.
11. Visualizar en el microscopio formas correspondientes a huevos de nematodos y cestodos.

Anexo 4. Técnica de coprocultivo para nematodos

1. En un recipiente de vidrio boca ancha previamente marcado depositar 500mg de pool de materia fecal positiva para nematodos comprobado por técnica de Mc Master.
2. Dejar en Incubadora a 27°C con una humedad relativa del 80% (Cámara Húmeda) por no menos de 14 días ya que es el tiempo estimado para que todos los huevos eclosionen.
3. Retirar de la incubadora y luego adicionar agua destilada hasta el borde del recipiente.
4. Colocar una placa de Petri invertida sobre el recipiente.
5. Invertir el recipiente con la placa con un movimiento firme.
6. Dejar salir un poco del agua a la placa de Petri.
7. Levantar ligeramente de la parte inferior del plato en un lado evitando el deslizamiento de este.
8. La preparación se deja durante 24 horas para que las Larvas en estadio L3 puedan migrar en el agua y establecerse.
9. Retirar con ayuda de una pipeta en tubos Falcón de 15 ml toda el agua presente en la placa de Petri, luego levantar suavemente el recipiente hasta volver a llenar de agua la placa y retirar de nuevo, continuar así hasta sacar por completo toda el agua del recipiente.
10. Centrifugar los tubos Falcón a 3.500 rpm por 10 minutos, descartar el sobrenadante dejando aproximadamente 2ml en cada tubo, resuspender con ayuda de un Vórtex y luego filtrar las impurezas con un colador a un Erlenmeyer todos los tubos obtenidos, continuar centrifugando, filtrando y condensando hasta quedar con 1 solo tubo.

Limpieza y Purificación Larvaria.

1. Tomar el Tubo resultante de la concentración de Larvas y Centrifugar a 3.500 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.
2. Paralelamente calentar 20 ml de Agua Destilada a 45° C.
3. Colocar de a 10 ml de Agua Caliente Destilada en 2 Tubos Falcón de 15 ml.
4. Colocar por la parte superior de los tubos un trozo de Guata en forma de tapón que solo sea sumergido unos milímetros.
5. Adicionar con ayuda de una pipeta a los tubos con tapón de Guata el concentrado Larvario.
6. Dejar migrar como mínimo 6 horas.
7. Por ultimo luego de la migración debe retirarse el tapón de Guata, tapar y Centrifugar de nuevo a 3.500 rpm por 10 min.
8. Eliminar el sobrenadante dejando un total de 2 ml aproximadamente.

Anexo 5. Extracción de ADN por el método fenol cloroformo

1. En el caso de extracción directa el parasito la muestra es retirada del frasco previamente marcado y se con agua ultra pura y para materia fecal se toman aproximadamente 20 mg.
2. Con bisturí cortar un fragmento del tejido con un peso aproximado de 1,5 a 6 mg, ubicarlo en una caja de Petri y secar con papel absorbente.
3. Depositar el contenido en un Eppendorf de 1,5 a 2,0 ml previamente esterilizado y marcado.
4. Adicionar 485 μ l de STE2 y 12 μ L de Proteinasa K (20mg/ml)
 1. Tapar y mezclar en Vórtex.
 2. Centrifugar 1 minuto a 10.000 r.p.m.
 3. Incubar durante toda la noche en baño serológico a 56°C en agitación constante a 150 r.p.m.
 4. Al siguiente día retirar los tubos del baño serológico y centrifugar a 14.000 r.p.m. por 1 minuto.
 5. Transferir 500 μ L del lisado en un tubo previamente esterilizado.
 6. Adicionar fenol-cloroformo-Isoamílico (25:24:1), homogenizar por inmersión durante 20 segundos.
 7. Se centrifuga por 3 minutos a 12.000 gravedades.
 8. Con ayuda de una pipeta se extrae la fase acuosa en un nuevo tubo.
 9. Adicionar cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1), homogenizar por inmersión
 10. Centrifuga a 12.000 gravedades durante 3 minutos.
 11. Con ayuda de una pipeta transferir la fase acuosa a un nuevo tubo adicionar 30 μ L de acetato de amonio y 750 μ L de etanol al 100%.
 12. Incubar por 2 horas a -20°C.
 13. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 revoluciones y descartar el sobrenadante
 14. El pellet se lava con 500 μ L de etanol al 70%, se resuspende y se centrifuga por 15 minutos a 12.000 gravedades
 15. Descartar el sobrenadante, se repite el lavado con etanol al 70% y centrifugar
 16. Eliminar el sobrenadante etanol y secar a 56°C
 17. Reconstituir el ADN con agua destilada o TE 1X.

Anexo 6. Protocolo de amplificación de PCR para primers paramcox1

ParamCOX1 F: 5'- GAT CCT GTK TTR TTT CAG CA -3'

ParamCOX1 R: 5'- TAA AGA HAR HAC ATA ATG AAA ATG A -3'

1. Identificar la cantidad de muestras que se desea analizar teniendo en cuenta el número de controles tanto positivos como negativos.
2. Descongelar y hacer vórtex previo antes de usar los reactivos
3. Preparar la mix, usando alícuotas de trabajo pertenecientes a los reactivos madre, los reactivos se adicionan en el siguiente orden: agua ultra pura, Buffer, MgCl₂, dNTPs, primers, usando puntas sin filtro.
4. Adicionar Taq Polimerasa, exponiéndola el menor tiempo posible a temperatura ambiente.
5. Usar tubos para PCR previamente esterilizados de acuerdo a la cantidad de muestras que se desea analizar.
6. Dispensar en cada tubo la concentración deseada de mix.
7. Adicionar 2µL de ADN (cantidad definida de acuerdo a las concentraciones obtenidas en las muestras) a cada tubo y homogenizar con la mix usando vórtex.
8. Dar un pequeño spin a los tubos para concentrar la muestra en el fondo del tubo.
9. Configurar y correr el termociclador de la siguiente manera: Desnaturalización 94°C – 5 minuto, amplificación de 35 ciclos (94°C – 30 segundos, 55°C – 50 segundos, 72°C – 30 segundos) y extensión final de 72°C – 7 minutos. Teniendo un tiempo total de corrido de 2 hora: 30 minutos.
10. Guarde en refrigeración los amplificados para realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El tamaño de banda esperado es de entre 440 y 450pb.

Anexo 7. Protocolo para electroforesis en geles de agarosa

PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA

1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración deseada en función del volumen del gel (ver tabla).
2. Añadir la agarosa al buffer TBE 0.5X en un matraz Erlenmeyer.
3. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido
4. Antes de que se gelifique el gel agregar SYBR Safe (1µl por cada 10ml de TBE 0.5%).
5. Mientras el gel se enfría preparar las bandejas donde será colocado el gel, colocando el dispositivo de manera correcta y la peinilla como se desea.
6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar aproximadamente 30 minutos a que solidifique.

Tabla. Concentración de agarosa en geles.

Agarosa %	Cantidad de agarosa en gr para 30ml de TBE	Cantidad de agarosa en gr para 50ml de TBE	Cantidad de agarosa en gr para 80ml de TBE
1.0	0.30	0.50	0.80
1.2	0.36	0.60	0.96
1.5	0.45	0.75	1.2
2.0	0.60	1.0	1.6

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1. Sobre una tira de papel parafilm mezclar 1 µl de buffer de carga (loading 6X) y 5 µl de muestra
2. El marcador de peso molecular se prepara de la siguiente manera: 1 µl de patrón de peso molecular, 1 µl de buffer de carga y 4 µl de agua ultra pura.
3. Una vez que el gel se ha solidificado colocarlo en la cámara de electroforesis.
4. Añadir TBE 0.5% (buffer de electroforesis) hasta que cubra la totalidad del gel.
5. Correr el gel durante 40 minutos a 80 voltios.
6. Una vez cumplido el tiempo colocar el gel en un tras iluminador para visualizar las bandas obtenidas.
7. Fografíar el gel en una foto documentador u otro sistema fotográfico disponible.

Anexo 8. Preparación de los purificados para secuenciación

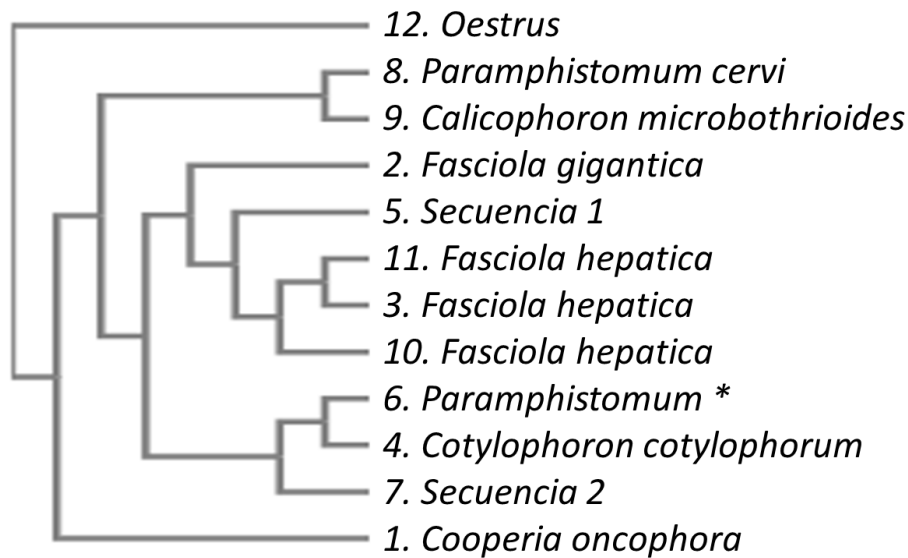
1. Esterilizar un tubo Eppendorf de 0,5 ml para depositar el resultado que se desea amplificar.
2. Observar la cuantificación de las muestras y de acuerdo a su valor hacer diluciones hasta obtener una concentración que se ubique entre 7-12 ng.
3. sacar 10µl de la dilución en el tubo estéril y adicionar 1,3 de primer.
4. Diligenciar el formato de secuenciación.
5. Enviar al servicio de secuenciación.

Anexo 9. Técnica de sedimentación rápida

1. Se toma entre 3 a 5 gramos de materia fecal (por muestra).
2. Se pasa la cantidad de muestra analizar a un recipiente, agregar entre 3 y 5 ml de detergente.
3. Homogenizar con el detergente ayudándose con un mortero.
4. Filtrar en un colador y depositar en un vaso cónico, aforar a 500 ml con agua.
5. Dejar reposar la mezcla durante 15 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y aforar nuevamente hasta 500 ml con agua.
7. Repetir el anterior procedimiento tres veces más.
8. Descartar el sobrenadante y pasar a una caja de Petri.
9. Agregar de 3 a 4 gotas de lugol.
10. Examinar con estereoscopio buscando formas correspondientes a *Fasciola hepática* y *Paramphistómidos*.

Nota: también se puede hacer el análisis de la muestra usando lamina portaobjetos y cubreobjetos, siendo observado en microscopio usando objetivos de 10X y 40X cuando sea necesario.

Anexo 10. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias obtenidas



Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias obtenidas y su relación con las secuencias identificadas en el gen bank: 1. *Cooperia oncophora* ID: AY229870. (Utrecht, Países Bajos) distancia 0.280346, 2. *Fasciola gigantica* ID: MF287791.1 (Vietnam) distancia 0.0369456, 3. *Fasciola hepatica* ID: KF111620.1 (Leon, España) distancia 0.00124688, 4. *Cotylophoron cotylophorum* ID: JX678239.1 (India) 0.0352349, 5. secuencia 1 que corresponde a *Fasciola hepatica* (Obtenida en el laboratorio 8 del instituto de genetica de la Universidad Nacional) distancia 0.309105, 6. *Paramphistomum* (union de secuencias obtenidas en el laboratorio 8 del instituto de genetica de la Universidad Nacional) distancia 0.0352349, 7. secuencia 2 correspondiente a *Paramphistomido* (Obtenida en el laboratorio 8 del instituto de genetica de la Universidad Nacional) distancia 0.0387927, 8. *Paramphistomum cervi* ID: KT198987.1 (China) distancia 0.0613126, 9. *Calicophoron microbothrioides* ID: KR337555.1 (China) distancia 0.0613126, 10. *Fasciola hepatica* ID: X15613.1 (Desconocido) distancia 0.00171514, 11. *Fasciola hepatica* ID: AF216697.1 (Australia) distancia 0.00124688, 12. *Oestrus* spp (Obtenida en el laboratorio 8 del instituto de genetica de la Universidad Nacional) distancia 0.309105.

REFERENCIAS

1. Uribarren T. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. [Online].; 2016 [cited 2017 Abril 15. Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trematodos.html>.
2. Paz A. Parafistomosis bovina: enfermedad emergente en el área mediterránea. In Actas del XIV congreso internacional de la federación mediterránea de sanidad y producción de rumiantes, Lugo- Santiago de compostela; 2006; Santiago de compostela, España. p. 5.
3. López L, Romero J, Velazquez L. Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja en el trópico alto en el occidente de Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 2008 Enero; 21.
4. Álvarez A, Boyaca M. Comparación de la técnica de Dennis con los hallazgos hepáticos post-mortem para el diagnóstico de fasciolosis bovina. Cultura científica. 2009; 7.
5. Alarcon E, Velasquez L. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (digenea: paramphistomidae) hallado en bovinos en Rionegro Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 2009 Abril; 22.
6. López J, Velasquez L. *Cotylophoron panamensis* (Digenea: Paramphistomidae) en bovinos del meta y del guaviare, Colombia. Acta Biol, Colomb. 2012 Julio; 17(2).
7. Estrada V, Gómez M, Velasquez L. La higiene del ganado y la fasciolosis bovina, Medellín y Rionegro 1914-1970. Iatreia. 2006 Diciembre; 19(4).
8. Palma L, Peña R, Becerra W. Prevalencia de fasciolosis humana y bovina en una hacienda de la Lejía, Municipio de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2013; 11(1).
9. Forlano M, Henriquez H, Melendez R. Incidencia y prevalencia de *Cotylophoron* spp. (Trematoda: Digenea) en bovinos del asentamiento campesino "Las Majaguas". Portuguesa-Venezuela 1996-1997. Gaceta de ciencias veterinarias. 2001 Enero; 7(1).
10. Bonilla R. "Diagnóstico y control de trematodosis en ganado vacuno de Colombia: Fasciolosis y paramphistomidosis". Tesis Doctoral. Lugo: Universidade De Santiago De Compostela, Lugo; 2016.
11. Gutierrez J. Fasciolosis Bovina. Sitio argentino de producción animal. 2004; 37.
12. Correa S, Martínez Y, López J, Velasquez L. Evaluación de la técnica modificada de Dennis para el diagnóstico de fasciolosis bovina. Biomedica. 2016 Octubre; 36.
13. Thanh H, Blair D, McManus D. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. Trends on parasitology. 2002 Mayo; 18(5).
14. Amor B, Halajian A, Farjallah S, Merella P, Said K, Slimane B. Molecular characterization of *Fasciola* spp. From the endemic area of the northern Iran based on nuclear ribosomal sequences. Experimental Parasitology. 2011 abril; 128.
15. Liu G, Gasser R, Young N, Song H, Ai L, Zhu X. Complete mitochondrial genomes of the "intermediate form" of *Fasciola* and *Fasciola Gigantica*, and their comparison with *F. hepatica*. Parasites & Vectors. 2014; 7.

- 16 Wit J, Gilleard J. Resequencing Helminth Genomes for Population and Genetic Studies. Trends in Parasitology. 2017 Mayo; 33(5).
- 17 Martin R. Caracterización molecular de *Fasciola hepática* procedente de diferentes hospederos, bovino, ovino y porcino mediante marcadores. Trabajo de grado para título de doctorado. San Antonio de Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca; 2014.
- 18 Thanh H L, Blair D, McManus D. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. Trends on parasitology. 2002 Mayo; 18(5).
- 19 Yan H WXLZLLBDYHCJDXLMZXCXJW. The Mitochondrial Genome of *Paramphistomum cervi* (Digenea), the First Representative for the Family Paramphistomidae. PLOS ONE. 2013 Agosto; 8(8).
- 20 Bonilla R. "DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE TREMATODOSIS EN GANADO VACUNO DE COLOMBIA: FASCIOSIS Y PARAMPHISTOMIDOSIS". Tesis Doctoral. Lugo: UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Lugo; 2016.
- 21 Gómez M. Legislación e higiene veterinaria: Medellín, 1913-1926. Historia Crítica. Universidad de los Andes. 2010 Agosto; 41.
- 22 López J. Situación actual de la Paramphistomosis en México. Monografía. Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Torreon; 2013.
- 23 Alarcon E, Velasquez L. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (digenea: paramphistomidae) hallado en bovinos en Rionegro Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 2009 Abril; 22.
- 24 Vargas D, Vega M, González C. Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepática* por la técnica RAPDs - PCR. Parasitol Latinoam. 2003; 58.
- 25 Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo JTKST, Fukuda K. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitology. 2005 julio; 131.
- 26 Pinedo R, Chávez A, Casas E. PREVALENCIA DE TREMATÓDES DE LA FAMILIA PARAMPHISTOMATIDAE EN BOVINOS DEL DISTRITO DE YURIMAGUAS, PROVINCIA DE ALTO AMAZONAS, LORETO. Rev Inv Vet Perú. 2010; 21(2).
- 27 Díez P. *Fasciola* y fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias.. Discurso de ingreso como académico de número. Santiago de Compostela: Academia de farmacia de Galicia, Santiago de Compostela; 2011.
- 28 Wilches C, Jaramillo J, Muñoz D, Robledo S, Velez I. Presencia de infestación por *Fasciola hepática* en habitantes del valle de San Nicolás, oriente antioqueño. REVISTA INFECTIO. 2009 junio; 13(2).
- 29 Khedri J, Radfar M, Borji H, Mirzaei M. Prevalence and Intensity of *Paramphistomum* Spp. In Cattle from South-Eastern Iran. Iran J Parasitol. 2015 junio; 10(2).
- 30 Becerra M. Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepática* en Latinoamérica. Rev Col Cienc Pec. 2001 Agosto; 14(1).
- 31 Velástegui F, Guerra J. PREVALENCIA DE PARASITOSIS POR *Paramphistomum* spp. EN GANADO BOVINO DEL CANTÓN EL CHACO, PROVINCIA DEL NAPO. Trabajo de grado. Quito: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, Provincia del Napo; 2012.

- 32 Quiroz H. Parasitología. Cuarta reimpression ed. Mexico. D.F. : LIMUSA. S.A. ; 1990.
- 33 Fuentes M. Paramfistomosis bobina por *Calicophoron daubneyi* en el noroeste de Castilla y León: estudio epidemiológico, lesional y de la respuesta inmunitaria local. Tesis Doctoral. Universidad de León, León ; 2015.
- 34 Sanabria R. Trematodes de los rumiantes domesticos. CEDIVE, Fac. Cs. Veterinarias, UNLP. 2009.
- 35 Martínez M, F RV. Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitol Res.* 2014 mayo.
- 36 Sánchez N, Tantalean M, Chávez A, Soto A. Presencia de *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Taramphistomidae) en bovinos de Loreto, Perú. *Rev. peru. biol.* 2009 Agosto; 16(1).
- 37 Piedrafita D, Raadsma H, Gonzalez J, Meeusen E. Increased production through parasite control: can ancient breeds of sheep teach us new lessons? *Trends in Parasitology.* 2010; 26(12).
- 38 Cabra A, Herrera C. Estudios de prevalencia de la *Fasciola hepatica* y caracol *Lymnaea* spp. en predios del municipio de Simijaca Cundinamarca. Trabajo de grado. Bogota D.C: Universidad de la Salle, Bogotá D.C; 2007.
- 39 Robles C, Olaechea F, Larroza M, Reynals J. Control y prevención de enfermedades del ganado bovino de pequeños productores del oeste de las provincias de Neuquén y Río Negro. *Proinder.* 2005 Marzo; 1.
- 40 Paucar S CACESF. PREVALENCIA DE FASCIOLIASIS Y PARAMFISTOMIASIS EN EL GANADO LECHERO DE OXAPAMPA, PASCO. *Rev Inv Vet Perú.* 2010; 21(1).
- 41 Bedoya J, al. e. Primer registro de focos de fasciolosis y paramfistomosis en bovinos doble propósito, Gómez Plata, Antioquia, Colombia. Universidad de Antioquia. 2012 Diciembre; 3(1).
- 42 Pulido A, Castañeda R, Arbelaez G. *Fasciola hepatica*: pedagogía de diagnóstico por laboratorio y su situación en Colombia. *REDVET.* 2010 Mayo; 12(5).
- 43 Daltinico. Atlas geográfico. [Online].; 2013 [cited 2017 Septiembre 15. Available from: <http://atlasgeografico.net/la-ganadera-en-colombia.html>.
- 44 González C, Sanchez G, Castro C, Gómez C, Molina F, Velasquez L. Control de *Fasciola hepatica* en el agua de consumo animal a través de filtración rápida y lenta. *Revista EIA.* 2013 Junio; 10(19).
- 45 Martínez A, Gonzalez M, Martínez M, Castro J, gonzalez C, Miñambres B, et al. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Veterinary Parasitology.* 2013 Diciembre.
- 46 FEDEGAN. Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina. [Online].; 2017 [cited 2017 Septiembre 16. Available from: <http://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina>.
- 47 Gálvez A, Duue J, Velásquez L. “La enfermedad es otra”: itinerario terapéutico de la fasciolosis bovina en Rionegro (Antioquia). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 2012 Junio; 7(1).

- 48 Organización Mundial de la Salud. Enfermedades Emergentes/Reemergentes. [Online].; 2007 [cited 2017 Septiembre 13. Available from: http://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=78:enfermedades-emergentes-reemergentes&Itemid=1005.
- 49 Sindičić M, Martinković F, Strišković T, Špehar M, Štimac I, M B, et al. Molecular identification of the rumen flukes *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* in a concurrent infection of the red deer *Cervus elaphus*. *Journal of Helminthology*. 2016 Septiembre.
- 50 123RF. Foto de archivo - Mapa mundial. [Online].; 2017 [cited 2017 Septiembre 17. Available from: https://es.123rf.com/photo_27471410_mapa-mundial.html.
- 51 Moriena R, Alvarez , Alvarez A, de Racioppi O, Lombardero O. Diagnóstico de *Fasciola hepática* por Detección de Coproantígenos y Coprología Clásica; su Comparación.. Trabajo Preliminar en la Provincia de Corrientes- Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE - Cátedra "Parasitología y Enfermedades Parasitarias". Corrientes: Universidad nacional del Nordeste, Corrientes.
- 52 Pajuelo G, al. e. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. *Rev Biomed*. 2006; 17.
- 53 Universidad Nacional de la Plata. Manual interno de técnicas de diagnóstico parasitológico. Manual. La Plata: Universidad Nacional de la Plata, La Plata.
- 54 Charlier J VDVMKFSPVJ. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology*. 2014 julio; 30(7).
- 55 Gissepe R. Caracterización molecular de *Fasciola hepática* procedente de diferentes hospedero, bovino, ovino y porcino mediante marcadores. Trabajo de grado para título de doctorado. San Antonio de Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca; 2014.
- 56 Aziz A, Blaxter M. Functional genomics for parasitic nematodes and platyhelminths. *Trends in parasitology*. 2004 Abril; 20(4).
- 57 Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en discapacidad*. 2013 Agosto; 2(2).
- 58 Universidad de Granada.. Aplicación de la PCR: diagnóstico de parásitos. [Online].; 2018 [cited 2018 febrero 15. Available from: <http://fciencias.ugr.es/practicasdcentes/aplicacion-de-la-pcr-diagnostico-de-parasitos>.
- 59 Restrepo Cardona LC. Estandarización y optimización de los protocolos para la extracción de ADN y amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de heces de ocelote (*Leopardus pardalis*). Trabajo de grado. Bogota. D.C: Pontificia Universidad Javeriana , Bogota. D.C; 2010.
- 60 Králová-Hromadová I, Špakulová , Horáčková E, Novobilský A, Beck R, Koudela B, et al. Sequence Analysis of Ribosomal and Mitochondrial Genes of the Giant Liver Fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): Intraspecific Variation and Differentiation from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*. 2008; 94(1).
- 61 Agromeat. TÉCNICA DE NECROPSIA EN RUMIANTES. Colegio Veterinario de Chile. 2010 Septiembre .

- 62 Rodriguez L. Determinación de la presencia de *Fasciola hepatica* en bovinos . sacrificados en la planta de beneficio del municipio de Sutamarchan- Boyaca. trabajo de grado. Tunja: Fundacion universitaria Juan de Castellanos, acultad de ciencias agrarias; 2014.
- 63 Sanchez J. Relación presencia de *Fasciola hepatica* (*distomum hepaticum*) en ovinos y . bovinos del municipio de Chivata-Boyaca.. trabajo de grado. Tunja: Fundacion Universitaria Juan de Castellanos, Facultad de ciencias Agrarias; 2013.
- 64 Moazeni M, Sharifiyazdi H, Afshin I. Characterization of *Fasciola hepatica* genotypes . from cattle and sheep in Iran using cytochrome C oxidase gene (CO1). *Parasitol Res.* 2011 Diciembre.
- 65 Peng , Ichinomiya , Ohtori , Ichikawa , Shibahara T, Itagaki T. Molecular . characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Res.* 2009 Mayo; 105.
- 66 Paz C. Comparación de la inhibición de reacción en cadena de la polimerasa según la . extracción de DNA de *Cryptosporidium* spp-. Trabajo de grado de pregrado. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias; 2014.
- 67 Hong-Bin Y, al e. The Mitochondrial Genome of *Paramphistomum cervi* (Digenea), the . First Representative for the Family Paramphistomidae. *Plos One Neglectec.* 2013 Agosto; 8(8).
- 68 Palma L PRBW. Prevalencia de fasciolosis humana y bovina en una hacienda de la . Lejia,Municipio de Pamplona,Norte de Santander,Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* 2013; 11(1).