

Identificación de especies de moluscos Lymnaeidae relacionadas con la transmisión de fasciolosis en Santander y Boyacá

Andrés Esteban Pereira Patiño

Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Microbiología

Director

Nelson Uribe Delgado

Doctor en Ciencias de la Salud Humana

Codirector

Jean-Pierre Pointier

Doctor en Ciencias

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Salud

Escuela De Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2019

A Sonia y Paola

Tabla de contenido

Introducción.....	14
1. Planteamiento del problema y pregunta de investigación.....	16
2. Marco conceptual y estado del arte.....	21
2.1 Moluscos de la familia Lymnaeidae.....	21
2.2 Sistemática de Lymnaeidae.....	23
2.3 Diversidad de Lymnaeidae en Colombia.....	28
2.4 Relación entre limneidos y fasciolosis.....	30
2.5 Importancia de la fasciolosis.....	31
2.6 Presentación de los departamentos de Santander y Boyacá.....	34
2.6.1 Santander.....	36
2.6.2 Boyacá.....	38
3. Objetivos de investigación.....	39
3.1 Objetivo general.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. Metodología.....	40
4.1 Muestreo de moluscos Lymnaeidae en veredas de Santander y Boyacá en diferentes pisos térmicos.....	40
4.2 Clasificación de limneidos por características morfológicas.....	42
4.3 Confirmación de las especies de limneidos por el marcador molecular COI.....	43
4.3.1 Extracción de ADN.....	43
4.3.2 Amplificación del marcador COI por PCR de punto final.....	43

4.3.3	Secuenciación de los amplificados.....	44
4.3.4	Alineamiento de secuencias.....	44
4.4	Determinación de la infección natural de los limneidos colectados.....	44
4.5	Registro y análisis de datos.....	45
5.	Consideraciones éticas.....	45
6.	Cronograma.....	48
7.	Presupuesto.....	49
8.	Resultados y discusión.....	50
8.1	Muestreo de moluscos Lymnaeidae.....	50
8.1.1	Muestreo en Santander.....	57
8.1.2	Muestreo en Boyacá.....	60
8.1.3	Muestreo en municipios limítrofes.....	61
8.2	Clasificación morfológica de limneidos.....	63
8.2.1	<i>Galba cousini</i> (Jousseaume, 1887).....	65
8.2.2	<i>Pseudosuccinea columella</i> (Say, 1817).....	68
8.2.3	<i>Galba truncatula</i> (O.F. Müller, 1774).....	70
8.2.4	<i>Galba schirazensis</i> (Küster, 1862).....	73
8.3	Confirmación molecular de especies de limneidos.....	78
8.3.1	Extracción de ADN.....	79
8.3.2	Amplificación del marcador COI por PCR de punto final.....	81
8.3.3	Secuenciación de los amplificados.....	82
8.3.4	Alineamiento de secuencias.....	83
8.4	Infección natural por <i>Fasciola hepatica</i> en limneidos.....	84

8.5 Distribución de especies de limneidos en Santander, Boyacá y municipios límitrofes.....	90
8.6 Especies de limneidos en Santander y Boyacá y sus implicaciones en la transmisión de fasciolosis.....	100
9. Conclusiones.....	102
Referencias bibliográficas.....	104
Apéndices.....	118

Lista de figuras

Figura 1. Ubicación de los departamentos de Santander y Boyacá.....	35
Figura 2. Municipios muestreados en el departamento de Santander.....	59
Figura 3. Municipios muestreados en el departamento de Boyacá.....	60
Figura 4. Municipios muestreados en el departamento de Norte de Santander.....	62
Figura 5. Localización del municipio de Zipacón en departamento de Cundinamarca.....	63
Figura 6. Proceso de disección en un espécimen de <i>Galba cousini</i>	64
Figura 7. <i>Galba cousini</i>	66
Figura 8. Ultraestructura de la concha de <i>Galba cousini</i>	67
Figura 9. Anatomía de sistema reproductor de <i>Galba cousini</i>	68
Figura 10. <i>Pseudosuccinea columella</i>	69
Figura 11. Anatomía de sistema reproductor de <i>Pseudosuccinea columella</i>	70
Figura 12. <i>Galba truncatula</i>	72
Figura 13. Anatomía de sistema reproductor de <i>Galba truncatula</i>	73
Figura 14. <i>Galba schirazensis</i>	75
Figura 15. Anatomía de sistema reproductor de <i>Galba schirazensis</i>	76
Figura 16. Anatomía del complejo peneal y próstata de limneidos del neotrópico.....	77
Figura 17. Morfología de limneidos del neotrópico.....	78
Figura 18. Gráfica de absorbancia del ADN por NanoDrop.....	79
Figura 19. PCR para el marcador COI.....	81
Figura 20. Cromatograma de secuenciación de ADN.....	82
Figura 21. Estadios larvarios de <i>F. hepatica</i> en <i>Galba cousini</i> y <i>Galba truncatula</i>	88

Figura 22. Oligoquetos en <i>Galba cousini</i>	89
Figura 23. Distribución de especies de limneidos en Santander, Boyacá.....	90
Figura 24. Distribución de especies de limneidos en Norte de Santander, Cundinamarca.....	91
Figura 25. Hábitat de <i>Galba cousini</i>	96
Figura 26. Hábitat de <i>Galba truncatula</i>	97
Figura 27. Hábitat de <i>Galba schirazensis</i>	98
Figura 28. Hábitat de <i>Pseudosuccinea columella</i>	99

Lista de tablas

Tabla 1. Cronograma propuesto para el año 2018.....	49
Tabla 2. Presupuesto estimado de la investigación.....	50
Tabla 3. Muestreos realizados entre 2015 y 2018.....	51
Tabla 4. Infección natural por <i>F. hepatica</i> en limneidos.....	86
Tabla 5. Distribución de limneidos en Santander, Boyacá, y municipios limítrofes.....	92

Lista de apéndices

A. Protocolo salidas de campo.....	118
B. Formato de recolección de moluscos limneidos.....	122
C. Protocolo de extracción de ADN.....	124
D. Protocolo de amplificación de ADN de limneidos.....	128

RESUMEN

TÍTULO: IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MOLUSCOS LYMNAEIDAE RELACIONADAS CON LA TRANSMISIÓN DE FASCIOSIS EN SANTANDER Y BOYACÁ*

AUTOR: ANDRÉS ESTEBAN PEREIRA PATIÑO**

PALABRAS CLAVE: LYMNAEIDAE, FASCIOSIS, SANTANDER, BOYACÁ.

DESCRIPCIÓN:

Lymnaeidae es una familia taxonómica de moluscos gasterópodos dulceacuícolas con distribución mundial, cuya diversidad y ecología ha sido poco estudiada en Colombia. La clasificación apoyada únicamente en caracteres morfológicos puede conducir a errores y confusiones, ya que presentan una gran diversidad de la concha y sustancial plasticidad fenotípica.

Algunas especies de Lymnaeidae actúan como hospederos intermediarios de parásitos trematodos, entre ellos *Fasciola hepatica*, agente etiológico de la fasciolosis.

La fasciolosis afecta principalmente al ganado ovino y bovino; también se considera una enfermedad emergente y reemergente en humanos. En Colombia se han reconocido zonas endémicas de fasciolosis animal en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño y Santander.

Teniendo en cuenta que la distribución de la fasciolosis depende fundamentalmente de la presencia y la dinámica de las especies de Lymnaeidae que actúan como hospederos intermediarios, se hace indispensable su correcta identificación tanto en zonas endémicas como en aquellas en las cuales no se ha reportado la enfermedad, para el correcto diseño de programas de prevención y control.

Con el ánimo de aportar información que contribuya al conocimiento de la diversidad de limneidos en Colombia, que a su vez sea útil en el diseño de programas de control de enfermedades en las que intervienen estos moluscos, especialmente fasciolosis, se desarrolló este trabajo de investigación cuyo objetivo fue identificar las especies de Lymnaeidae presentes en distintas zonas geográficas de Santander, Boyacá, y municipios limítrofes.

Se muestrearon 117 puntos georreferenciados en diferentes zonas geográficas de Santander, Boyacá, Norte de Santander y Cundinamarca, comprendidas entre los 126 m.s.n.m. y 3870 m.s.n.m. Los limneidos hallados se clasificaron inicialmente por características morfológicas de la concha y anatomía del aparato reproductor; la especie fue confirmada mediante pruebas moleculares utilizando el marcador mitocondrial COI. Los especímenes colectados se examinaron en busca de estadios larvarios de *F. hepatica*.

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: Nelson Uribe Delgado, Doctor en Ciencias de la Salud humana.

ABSTRACT

TITLE: IDENTIFICATION OF LYMNAEIDAE MOLLUSC SPECIES RELATED TO THE TRANSMISSION OF FASCIOSIS IN SANTANDER AND BOYACÁ *

AUTHOR: ANDRÉS ESTEBAN PEREIRA PATIÑO**

KEYWORDS: LYMNAEIDAE, FASCIOSIS, SANTANDER, BOYACÁ.

DESCRIPCIÓN:

Lymnaeidae is a taxonomic family of freshwater gastropod molluscs with worldwide distribution, whose diversity and ecology has not been much studied in Colombia. The classification based solely on morphological characters can lead to confusions, since they present a great diversity of the shell and substantial phenotypic plasticity.

Some species of Lymnaeidae act as intermediate hosts of trematode parasites of great importance in human and veterinary medicine, among them *Fasciola hepatica*, the etiological agent of fasciolosis.

Fasciolosis is a cosmopolitan disease that mainly affects sheep and cattle causing high economic losses. In addition, it is considered an emerging and reemerging disease in humans. In Colombia, endemic areas of animal fasciolosis have been recognized in the departments of Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño and Santander, where meat, milk and wool producers are economically affected.

Bearing in mind that the spatial and temporal distribution of fascioliasis depends fundamentally on the presence and dynamics of Lymnaeidae species that act as intermediate hosts, it is essential to correctly identify them both in endemic areas and those in which they are not has reported the disease, for the design of prevention and control programs.

With the aim of generate value information for to the knowledge of lymnaeid diversity in Colombia, as well as useful in the design of control programs, the objective of this work was to identify the Lymnaeidae species present in different geographical areas of Santander, Boyacá, and bordering municipalities.

118 georeferenced points were sampled in different geographical areas of Santander, Boyacá, Norte de Santander and Cundinamarca, between 126 M.A.S.L. and 3870 M.A.S.L. The lymnaeid found were initially classified by morphological characteristics of the shell and the reproductive system by taxonomic keys; the species was confirmed by molecular traits using the mitochondrial marker COI. The collected specimens were examined for larval stages of *F. hepatica*.

* Master Thesis

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: Nelson Uribe Delgado, Doctor en Ciencias de la Salud humana.

Introducción

Los moluscos Lymnaeidae son uno de los grupos de gasterópodos pulmonados más extendidos en el mundo (Dalton JP, 1999); su mayor diversidad se encuentra en el holoártico, aunque el neotrópico cuenta con especies nativas e introducidas (Strong, Gargominy, Ponder, & Bouchet, 2008). Si bien los Lymnaeidae son una de las familias de caracoles dulceacuícolas más importante, ha sido difícil lograr un consenso en cuanto a su clasificación en los niveles de subgénero y género (Aksenova et al., 2018). La mayoría de investigadores concuerdan en que la sistemática de Lymnaeidae es intrincada, compuesta por varias subfamilias, géneros y subgéneros.

La sistemática de Lymnaeidae durante los siglos XIX y XX basada en caracteres morfológicos tuvo como resultado la descripción de más de 1143 especies, compiladas por Hubendick en 1951 (Hubendick B., 1951), muchas de las cuales han sido consideradas sinónimos. Esto se debe a que presentan variabilidad de la concha y plasticidad eco-fenotípica, mientras que los patrones anatómicos internos permanecen muy homogéneos (Correa et al., 2011).

El desarrollo de herramientas moleculares para estudiar la filogenia y clasificación de los limneidos se convirtió en una necesidad para aclarar su confuso estado taxonómico. De esta manera, el uso de marcadores de ADN ribosomal como 18S, ITS-1, ITS-2, y mitocondriales como COI, ha permitido esclarecer su filogenia, reclasificar algunas especies y contribuir a homogenizar su nomenclatura (M. D. Bargues, Mera y Sierra, Gómez, Artigas, & Mas-Coma, 2006; M. Dolores Bargues & Mas-Coma, 1997; M.D. Bargues, Bargues, Mas-Coma, Bargues, & Mas-Coma, 2005; Maria D. Bargues, Mangold, Munoz-Antoli, Pointier, & Mas-Coma, 1997; Correa et al., 2010).

La clasificación errónea de las especies de limneidos en zonas endémicas de fasciolosis y otras trematodosis transmitidas por estos moluscos, representa un problema para el diseño de programas de prevención y control, pues no todas las especies participan de igual manera en la transmisión. La dinámica de la relación hospedero-parásito varía en cada especie, al igual que las tasas de reproducción y adaptabilidad a condiciones medioambientales. Por ejemplo, en el neotrópico han sido descritas más de diez especies, de las cuales actualmente ocho se consideran válidas, y no todas son igualmente susceptibles a la infección por trematodos ni se adaptan a los mismos hábitats (Correa et al., 2011; J. Guillermo Esteban et al., 2002; José Guillermo Esteban et al., 1997; Rondelaud, Vignoles, & Dreyfuss, 2004). Por lo tanto, identificar correctamente las especies ayuda a direccionar los programas de control.

En los departamentos de Santander y Boyacá se han reconocido zonas endémicas de fasciolosis donde se ven afectados principalmente los pequeños productores causándoles significativas pérdidas económicas representadas en el decomiso de hígados en los mataderos, reducción de la ganancia de peso, baja producción de leche y lana e incluso la muerte (Becerra Roza, 2009; González et al., 2011).

En estos departamentos han sido pocos los estudios epidemiológicos destinados a caracterizar los focos de fasciolosis y determinar las especies de hospederos intermediarios presentes. Por lo tanto, el objetivo de esta propuesta fue identificar las especies de moluscos de la familia *Lymnaeidae* presentes en Santander y Boyacá, puesto que algunas han sido relacionadas con la transmisión de fasciolosis en Colombia.

Este documento presenta los resultados del proyecto de investigación con el cual se desarrolló el objetivo planteado. Se incluye el planteamiento del problema y pregunta de investigación, marco conceptual y estado del arte, metodología, consideraciones éticas, presupuesto, resultados y conclusiones.

1. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

Los caracoles de la familia Lymnaeidae son moluscos pulmonados de agua dulce que han sido objeto de estudios taxonómicos, ecológicos y parasitológicos, en relación con su papel como hospederos intermediarios de parásitos de importancia en salud humana y veterinaria, ya que participan en la transmisión de al menos 71 especies de parásitos trematodos (M.D Barges et al., 2001; Correa et al., 2010). *Fasciola hepatica* es sin duda el caso más representativo de la relación limneido-trematodo, pues la fasciolosis es reconocida como un problema veterinario y de salud pública a nivel mundial (Mehmood et al., 2017).

En el marco de las estrategias de prevención y control de las trematodosis, es primordial la comprensión de los determinantes ecológicos y ambientales, ya que, dados los complejos ciclos de vida de estos parásitos, delimitan el alcance e impacto que pueda tener su transmisión (J-P Pointier & Giboda, 1999; J. . Pointier & David, 2004; Rim, Farag, Sornmani, & Cross, s/f). En este sentido, el diseño de estos programas debe estar soportado por una base científica sobre la transmisión de la parasitosis, y en el caso de la fasciolosis, es indispensable la ubicación de los

focos de infección y la correcta identificación de las especies de moluscos que actúan como hospederos intermediarios.

El estudio de los hospedadores intermediarios proporciona herramientas para su abordaje integral, y se ha demostrado su importancia para implementar medidas eficaces en el control de trematodos transmitidos por los alimentos, mediante el reconocimiento de las áreas de alto riesgo (J-P Pointier & Giboda, 1999; J. . Pointier & David, 2004; Rim et al., s/f).

Lo anterior tiene relación con el hecho de que no todas las especies de caracoles son igualmente susceptibles a la infección por trematodos ni comparten los mismos nichos. En el caso de fasciolosis, se ha demostrado que *Pseudosuccinea columella*, *Galba truncatula*, *Galba cubensis*, *Galba neotropica*, *Galba cousini*, *Fossaria bulimoides*, entre otras especies, son susceptibles; mientras que *Lymnaea fusca* es parcialmente resistente y *Stagnicola elodes* es totalmente refractario (Cruiz-Reyes & Malek, 1987; Dreyfuss, Abrous, & Rondelaud, 2000; McKown & Ridley, 1995; Rondelaud et al., 2004; Vignoles, Dreyfuss, & Rondelaud D.*, 2002). Es importante resaltar que algunas poblaciones de especies normalmente susceptibles pueden presentar resistencia a la infección por *Fasciola hepatica*, como se ha observado en *Pseudosuccinea columella* (Vázquez, Sánchez, Pointier, Théron, & Hurtrez-Boussès, 2014).

En el caso de *Galba schirazensis*, está considerada resistente por algunos autores (M. Dolores Barges, González, Artigas, & Mas-Coma, 2011). Sin embargo, estudios de infección experimental a nivel de laboratorio han demostrado la producción de redias y cercarias en cepas colombianas (Dreyfuss et al., 2015). Además, hay observaciones en campo de focos activos de

fasciolosis en Ecuador con la presencia solamente de *G. schirazensis* y el hallazgo de caracoles infectados con redias (Yannick Caron et al., 2017).

Como se viene mencionando, el rol de los moluscos Lymnaeidae en la transmisión de trematodos, en especial *F. hepatica*, realza la necesidad de profundizar en estudios poblacionales y de relación hospedero-parásito, para lo cual es imprescindible contar con el mayor número de mapas epidemiológicos de la distribución de especies correctamente identificadas.

El panorama general de la fasciolosis en términos epidemiológicos y económicos la destaca como un grave problema de salud en los rumiantes domésticos a nivel mundial. Esta parasitosis es una de las infecciones por helmintos más comunes del ganado ovino y bovino con prevalencias entre el 30% y 90%, afectando a más de 600 millones de animales principalmente en zonas tropicales (Mehmood et al., 2017; Recalde-Reyes et al., 2014). Es reconocida como un verdadero problema veterinario que causa pérdidas en la productividad de carne, leche y lana, responsable por grandes pérdidas en las economías nacionales, las cuales superan los 2000 millones de dólares por año a nivel mundial (Mehmood et al., 2017; Recalde-Reyes et al., 2014).

La fasciolosis es una enfermedad cosmopolita presente en todos los continentes. En Europa se ha reportado en diez países, siendo una de las infecciones helmínticas del ganado más frecuente. En el Reino Unido se estima una prevalencia en el ganado bovino y ovino que va del 48% al 76% (McCann, Baylis, & Williams, 2010), en Bélgica 37% (Bennema et al., 2009), en Alemania 50% (Kuerpick, Fiedor, von Samson-Himmelstjerna, Schnieder, & Strube, 2012), en España 61% (32), en Suiza 18% (Rapsch et al., 2006), y en Irlanda 28% (Mehmood et al., 2017). Las pérdidas

económicas han sido estimadas en 52 millones de euros por año tan solo en Suiza (Schweizer, Braun, Deplazes, & Torgerson, 2005).

En África la fasciolosis es reemergente en algunos países y la prevalencia media alcanza el 33% (Mehmood et al., 2017). Es una enfermedad importante en términos económicos, cuyas pérdidas anuales en productividad alcanzan cifras cercanas a los 200 millones de dólares en Uganda, Nigeria, Sudan y Etiopía (Mehmood et al., 2017).

La prevalencia de fasciolosis ha sido reportada en 13 países de Asia por medio de estudios que revelan rangos del 0.71% al 69.2% en bovinos, y hasta de 47% en ovinos, representando pérdidas económicas que van de los diez mil a los cien mil dólares (Mehmood et al., 2017).

En América Latina se han reportado prevalencias muy altas, por ejemplo, en Argentina se estima entre el 5% y 77%; en el norte del altiplano de Bolivia 30%, en la región de Cajamarca en Perú 60%, en el departamento de Salto en Uruguay 67%, en el sur de Brasil 14%; en Chile se encontró una prevalencia del 30% en hígados decomisados de bovinos (Carmona & Tort, 2017).

En Colombia la mayor prevalencia se presenta en las zonas ganaderas de climas fríos en donde es endémica y afecta al 25% del ganado lechero (Estrada, Gómez, & Velasquez, 2006). En Santander, estudios realizados por el Grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) dan cuenta de prevalencias hasta del 50% (datos sin publicar). Las pérdidas económicas anuales a nivel nacional fueron calculadas en 12483 millones de pesos en 1996 (Becerra Roza, 2009), cifras que deben ser actualizadas pues el impacto económico, a pesar de no estar debidamente cuantificado recientemente en nuestro país (ni en Latinoamérica), es negativo y

afecta los ingresos de los pequeños productores de leche, carne y lana, cuyo sustento está basado en un modelo de economía campesina.

Por otro lado, la fasciolosis es reconocida como una zoonosis emergente y reemergente. Se calcula que en el mundo entre 2.4 y 17 millones de personas están infectadas y 180 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad (Mehmood et al., 2017). En Colombia son pocos los casos reportados de fasciolosis humana (Wilches, Jaramillo, Muñoz, Robledo, & Vélez, 2009).

En Colombia, aunque se han realizado estudios que aportan información epidemiológica sobre la distribución y prevalencia de fasciolosis, han sido realizados en áreas muy focalizadas y en zonas donde hay reportes, lo cual limita el diseño apropiado de programas de prevención y control basados en la identificación de las áreas de alto riesgo (Estrada et al., 2006; Wilches et al., 2009).

Esta información es necesario analizarla y complementarla con la identificación de las especies de moluscos que actúan como hospederos intermediarios, y así avanzar hacia una comprensión integral del estado de la fasciolosis en el país. La distribución de esta parasitosis depende de la presencia y la dinámica de los moluscos que participan en la transmisión, que a su vez está relacionada con la existencia de cuerpos de agua y determinadas condiciones climáticas; así como de la presencia del parásito, que tiene gran capacidad colonizadora y un amplio rango de especies de hospederos intermediarios.

La diversidad de limneidos en nuestro país no ha sido estudiada detalladamente, lo que nos llevó a proponer la búsqueda e identificación de las especies presentes en diferentes zonas geográficas de Santander y Boyacá, tanto aquellas en donde se han reportado casos de fasciolosis bovina y

ovina, como en otras donde no se ha reportado. Durante el desarrollo del trabajo también se muestrearon algunas localidades de Norte de Santander y Cundinamarca. Este trabajo contribuye a la construcción del mapa epidemiológico de la distribución de limneidos en Colombia que permita relacionarlo con focos de la infección que posteriormente sirvan en la formulación de medidas de prevención y control de esta parasitosis.

Con base en lo expuesto anteriormente, las preguntas de investigación propuestas son: i) ¿Cuáles son las especies de moluscos de la familia Lymnaeidae presentes en algunas veredas de Santander, Boyacá, Norte de Santander, y Cundinamarca?, ii) ¿Cuál es la prevalencia de infección por *Fasciola hepatica* de los limneidos colectados en estas localidades?, y finalmente, iii) según la literatura ¿Cuáles de las especies presentes en el área de estudio han sido reportadas como hospederos intermediarios de *F. hepatica* en otras localidades del país o del mundo? Esta información puede contribuir a establecer el riesgo epidemiológico.

2. Marco conceptual y estado del arte

2.1 Moluscos de la familia Lymnaeidae

Los moluscos Lymnaeidae (conocidos comúnmente como *pond snails* en inglés), son gasterópodos pulmonados ampliamente distribuidos, con predominio en el hemisferio norte. En 2003 se hallaron fragmentos sin identificar de un limneido en la Antártida (Ashworth & Preece, 2003).

Los limneidos tienen un par de tentáculos sensoriales en la región cefálica y un ojo en la base de cada tentáculo. Todas las especies poseen tentáculos planos, anchos y triangulares. La gran mayoría son dextrógiros. Muchas especies tienen un diente en la rádula usado en la alimentación, principalmente a base de algas filamentosas, lo que los hace más herbívoros comparados con otras familias que se alimentan en mayor medida detritus o materia animal (Smith, 2001).

Como todos los moluscos pulmonados, los Lymnaeidae realizan el intercambio gaseoso por medio de una membrana vascularizada que recubre un espacio dentro del manto. Dicho espacio contiene una burbuja que es reemplazada en la superficie del agua; algunas especies llenan la cavidad con agua y viven sin necesidad de salir a la superficie (Smith, 2001).

Pueden llevar a cabo autofecundación o fecundación cruzada. Se reproducen por huevos de los cuales sale un pequeño molusco con concha. La temperatura afecta significativamente el ciclo de vida. Por lo general, las temperaturas cálidas aceleran el proceso de crecimiento que puede ir de 9 a 15 meses, mientras que algunas especies en temperaturas frías pueden tardar años para madurar y reproducirse (Rondelaud et al., 2004; Smith, 2001).

Los limneidos se pueden hallar en distintos hábitats, como arroyos o quebradas, estanques, canales, lagos naturales y artificiales, pantanos, ciénagas, campos de cultivos inundados, bebederos, drenajes, tanques, entre otros; son más comunes en aguas ricas en calcio y poco profundas, donde las temperaturas son mayores y disponen de más alimento (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014; Smith, 2001).

Su principal importancia es en salud humana y veterinaria porque actúan como hospederos intermediarios de trematodos que afectan tanto a humanos como animales, y que en el ámbito

veterinario ocasiona grandes pérdidas económicas. Los limneidos actúan como hospederos intermediarios de al menos 71 especies de trematodos distribuidas en 13 familias, incluyendo especies de Schistosomatidae y Echinostomatidae, siendo la más importante *Fasciola hepatica*. Al menos 20 especies de limneidos han sido descritas como potenciales transmisores de fasciolosis (Correa et al., 2010).

2.2 Sistemática de Lymnaeidae

Mollusca es uno de los filos más importantes del reino Animalia. Con más de 82000 especies válidas y un incremento anual de 580 nuevas especies descritas, es el segundo filo animal más numeroso, solo detrás de Arthropoda (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Gastropoda constituye la clase más extensa e importante de los moluscos, incluye alrededor de 50000 especies terrestres, marinas y dulceacuícolas distribuidas en 409 familias (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

El clado Pulmonata se caracteriza por la ausencia de opérculo y por presentar hermafroditismo. Su reproducción generalmente es por fecundación cruzada, sin embargo, la autofecundación se observa comúnmente en algunas familias como Lymnaeidae o Planorbidae (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Esta última característica es importante para la sistemática porque afecta directamente los procesos de evolución a nivel genético (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). La autofecundación permite la multiplicación de individuos altamente adaptados a un nicho ecológico particular, pero presenta la desventaja de disminuir la plasticidad adaptativa.

Es quizás por esta razón que la mayoría de especies autofecundantes son facultativas (Frankel & Galun, 1977).

En el clado Hygrophila se encuentran aquellos gasterópodos pulmonados cuyo hábitat comprende cuerpos de agua dulce. Incluye cinco familias: Acroloxidae, Chiliniidae, Lymnaeidae, Physidae y Planorbidae. Su diversidad ha sido estimada en 125 géneros y 900 especies (Bouchet et al., 2017; Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

Por mucho tiempo la sistemática de los gasterópodos se ha construido a partir del análisis de ilustraciones de las características morfológicas, incluyendo la concha y la anatomía de las partes blandas. Actualmente, su origen y clasificación se define con la ayuda de marcadores moleculares, isoenzimas y otras herramientas de biología molecular (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

En cuanto al estudio de los moluscos de la familia Lymnaeidae, más de 1000 especies han sido descritas, sin embargo, la validez de muchas de ellas se mantiene en actualización, y algunos autores consideran que su diversidad no supera más de 100 especies (Hubendick B., 1951; Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Wladimir Lobato Paraense realizó los estudios taxonómicos más importantes del género *Lymnaea* en América del Sur, describiendo detalladamente las características morfológicas del sistema reproductor, riñones, y concha de seis especies (Carvalho et al., 2004; Paraense, 1983, 2003, 2004, 2005). Esta metodología ha sido aplicada y complementada por otros investigadores con estudios de isoenzimas y técnicas

moleculares en poblaciones de América Latina (M. D. Bargues, Artigas, Mera y Sierra, Pointier, & Mas-Coma, 2007; Carvalho et al., 2004; Jabbour-Zahab et al., 1997).

La sistemática de este género ha sido motivo de controversia desde hace mucho tiempo (M. D. Bargues et al., 2007; Dalton JP, 1999; Mas-Coma, 2005). Las diferencias entre las especies, condicionada por la variabilidad intraespecífica de la concha y la escasez de características diferenciales de valor sistemático-taxonómico en la morfo-anatomía interna, son un gran problema y hace que la clasificación sea muy difícil y a veces imposible. Los miembros de la familia Lymnaeidae exhiben una gran diversidad de la concha y sustancial plasticidad fenotípica. En contraste, sus patrones anatómicos internos son extremadamente homogéneos (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014), lo cual genera confusiones cuando se cree tener una sola especie y en realidad se tienen varias especies crípticas; otras veces se cree tener varias especies pero realmente se está manejando una sola con gran variabilidad intraespecífica (Cordero del Campillo, 2001; Dalton JP, 1999). Esta problemática produjo que algunos especialistas aceptaran “*Lymnaea*” *sensu lato* como único género, mientras que otros investigadores reconocieran una variedad de géneros como *Galba*, *Fossaria*, *Pseudosuccinea* (Correa et al., 2010).

Las relaciones filogenéticas entre los miembros de Lymnaeidae han sido inferidas parcialmente a partir de varios estudios (M.D. Bargues et al., 2005; Dayrat et al., 2011; Puslednik, Ponder, Dowton, & Davis, 2009; E. Remigio, 2002; Elpidio A. Remigio & Hebert, 2003; Elpidio A. Remigio & Blair, 1997). Sin embargo, aunque se han realizado varios esfuerzos para resolver su filogenia, se evidencian limitaciones, como la cantidad de marcadores utilizados o las áreas geográficas cubiertas (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Debido a su importancia

como hospederos intermediarios de trematodos, es necesario contar con un sólido conocimiento sobre su marco filogenético para lograr un mejor entendimiento de la coevolución Lymnaeidae-*Fasciola* y la interacción hospedero-parásito (Correa et al., 2010).

La filogenia de Lymnaeidae más completa en la actualidad es la realizada por Correa, *et al.*, 2010, en la cual se utilizaron secuencias de los marcadores ITS1, ITS2 y 16S de 50 taxones colectados en cinco continentes, incluyendo la mayoría de especies del neotrópico (Correa et al., 2010). Este estudio reveló la existencia de tres clados principales de acuerdo a su origen geográfico: C1-América (C1a y C1b), C2-Eusaria, y C3-Australasia (Correa et al., 2010).

Con base en los resultados de este estudio, se han propuesto ajustes a la nomenclatura de acuerdo con los lineamientos de la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, el clado C1a incluye especies en los géneros *Lymanea* (Lamarck, 1799), *Galba* (Schrank, 1803), *Fossaria* (Westerlund, 1885) y *Bakerilymnaea*, por lo que se propone unificarlas en el género *Galba*. Para el clado C3a se propone unificar a *Bullastra*; y para el C2, el género más adecuado sería *Lymnaea*, ya que la especie tipo de *Lymnaea* es *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), la especie tipo de *Stagnicola* (Jeffreys, 1830), es *Stagnicola palustris* (= *Lymnaea palustris*); y la especie tipo de *Omphiscola* (Rafinesque, 1819) es *Omphiscola glabra*. Sin embargo, las tres especies pertenecen al mismo clado (Correa et al., 2010).

Descripciones anatómicas y moleculares de las especies del neotrópico han sido realizadas por varios investigadores (Artigas, Bargues, Mera y Sierra, Agramunt, & Mas-Coma, 2011; M. Dolores Bargues et al., 2011; Maria D. Bargues, Mangold, Muñoz-Antoli, et al., 1997; María

Dolores Barges, Mera Y Sierra, Gómez, Artigas, & Mas-Coma, 2007; Correa et al., 2011; González et al., 2011; J. P. Pointier et al., 2006). En un estudio realizado por Correa, *et al.*, 2011, se concluyó que el marcador mitocondrial COI puede utilizarse como código de barras para la determinación de especies de limneidos en el neotrópico. Este marcador permite conocer la variabilidad inter e intra-específica en limneidos con distancias genéticas entre el 6% y 7%; además, presenta la ventaja de utilizar cebadores universales y disponer de secuencias en bases de datos como GenBank para hacer alineamientos. Sin embargo, presenta dificultades para la clasificación taxonómica del género *Radix* (Correa et al., 2011).

Las especies del neotrópico se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a las características morfológicas de su concha y aparato reproductor permitiendo identificar de manera tentativa la especie. Por un lado, *Galba cousini*, *Pseudosuccinea columella*, *Lymnaea diaphana* y *Lymnaea rupestris* presentan rasgos morfológicos de la concha que permiten diferenciarlas más fácilmente. *G. cousini* y *P. columella* se pueden diferenciar de manera relativamente fácil por las características de la concha y las dimensiones del adulto, al igual que por la anatomía del complejo peneal y próstata. Por otro lado, la clasificación de *G. cubensis*, *G. viator*, *G. truncaluta* y *G. schirazensis* con base en la concha y partes blandas puede resultar compleja dada su homogeneidad, siendo indispensable la confirmación molecular por marcadores como COI, el cual ya se ha usado en la identificación de limneidos en Colombia (Correa et al., 2011), (Uribe, Becerra, & Velásquez, 2014; Velásquez, 2011).

2.3 Diversidad de Lymnaeidae en Colombia

En Colombia se han reportado cinco especies de limneidos válidas: *Galba cousini*, hallado en Antioquia, Boyacá, Nariño, Norte de Santander y Santander (59, datos del grupo GIEM sin publicar); *Galba cubensis* hallado en Barbosa, Antioquia (Correa et al., 2011); *Pseudosuccinea columella*, localizado en el municipio de Rio Negro, Antioquia, y regiones de Santander (Correa et al., 2011); *Galba truncatula*, en Norte de Santander (59, datos del grupo GIEM sin publicar); y una especie identificada recientemente como *Galba schirazensis* (*Galba* sp.) encontrada en Río Negro y Matasano (Antioquia), Zipacón (Cundinamarca) y Barbosa (Santander) (5, datos del grupo GIEM sin publicar).

En el departamento de Cundinamarca, los primeros estudios sobre limneidos reportaron las especies *L. ubaquensis* en la laguna de Ubaqué y *L. bogotensis* en la Sabana de Bogotá. Actualmente se reconoce que *L. ubaquensis* es sinónimo de *Pseudosuccinea columella*, y que *L. bogotensis* es sinónimo de *Galba cousini* (Velásquez, 2006).

La especie *G. cousini* ha sido encontrada en los páramos andinos de Colombia y Ecuador relacionada con la transmisión de fasciolosis en estas regiones; en Venezuela también se ha reportado, pero su rol en la transmisión de fasciolosis no ha sido demostrado (J. P. Pointier, Noya, de Noya, & Théron, 2009). La diversidad genética de esta especie ha sido estudiada en poblaciones colombianas procedentes de Santander, Norte de Santander, Nariño y Cundinamarca, donde se han identificado dos nuevos haplotipos por medio del marcador molecular COI (Uribe et al., 2014). En

el municipio de Onzaga (Santander) se describió un foco de fasciolosis a 2031 m.s.n.m. asociado a esta especie, siendo el reporte a menor altitud en el país (Uribe, Pereira, & Jean-Pierre, 2017).

Galba schirazensis fue descrita por Heinrich Carl Küster en 1862. La especie tipo proviene de Shiraz (Irán), que le otorga el nombre a la especie. Estudios de Bargues y colaboradores (M. Dolores Bargues et al., 2012), la ubican en el grupo *Galba/Fossaria*. Por su morfología, esta especie puede ser fácilmente confundida con *Galba truncatula* y *Galba cubensis*, aunque genéticamente son distantes. La especie fue descrita inicialmente en Irán, y está presente en Oriente próximo y países como Afganistán, sin embargo, su diversidad genética es más alta en América que en el viejo mundo sugiriendo fuertemente que su origen podría ser el nuevo mundo (Manon Lounnas, Correa, et al., 2017). Su rol en la transmisión de fasciolosis es discutido, a pesar de que se ha encontrado en focos activos de fasciolosis en Ecuador (Yannick Caron et al., 2017).

Pseudosuccinea columella es una especie nativa de América del Norte y Europa. La localidad tipo se ha propuesto en Philadelphia, Estados Unidos. La especie ha sido introducida a Australia, Europa, América central y del sur, algunos países de África e islas del pacífico. *Galba cubensis* es una especie nativa del nuevo mundo cuya localidad tipo está ubicada en Cuba. Está ampliamente distribuida por el continente americano, desde Estados Unidos, Centroamérica, las Antillas mayores y menores, y Sudamérica (Manon Lounnas, Vázquez, et al., 2017; Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

La diversidad de limneidos en Colombia no se conoce en profundidad, sólo se han reportado especies en zonas focalizadas y en relación con la presencia de *F. hepatica*. Por otro lado, no todas

las especies reportadas han sido identificadas rigurosamente y apoyadas en marcadores moleculares (Cabra Angel & Herrera Huérfano, 2007).

2.4 Relación entre limneidos y fasciolosis

Varios estudios han señalado cómo cepas de *F. hepatica* y especies de limneidos pueden aumentar la transmisión a través de la posible adaptación local (Yannick Caron et al., 2017; Rokni, Massoud, O'Neill, Parkinson, & Dalton, 2002). Como se ha mencionado anteriormente, la introducción y propagación del parásito depende en última instancia de su compatibilidad con los caracoles hospederos intermediarios que habitan nuevas localidades (Rokni et al., 2002).

De otro lado, en localidades donde se encuentra más de una especie de limneido involucrada en la transmisión, se ha evidenciado que una de ellas puede ser más compatible, relegando a la otra especie como hospedero de importancia secundaria. Esto ha sido observado en Cuba, donde *G. cubensis* es el principal hospedero intermediario, por encima de *P. columella* (Vázquez et al., 2014); mientras que lo contrario ocurre en América del Norte, siendo *P. columella* más susceptible a la infección por *F. hepatica* comparada *G. cubensis* (Vázquez et al., 2014).

Es interesante resaltar el hallazgo de poblaciones de *P. columella* resistentes a la infección por el parásito en algunas zonas, lo cual reduce la posibilidad de transmisión por esta especie (Gutiérrez et al., 2011; Vázquez et al., 2014). Sin embargo, las variaciones en susceptibilidad entre las poblaciones de *P. columella* no parecen estar correlacionadas con su diversidad genética, como ha sido observado en estudios moleculares de diversas poblaciones de esta especie a nivel global (M. Lounnas et al., 2017; Vázquez et al., 2014).

En cuanto a la infección natural de los limneidos por *Fasciola hepatica*, es poca la información reportada en la literatura. *Galba cousini* ha sido encontrada parasitada naturalmente en Ecuador y Colombia (70, datos sin publicar); *Pseudosuccinea columella* en Argentina, Brasil y Cuba (Gutiérrez et al., 2011); por eso, uno de los objetivos de este trabajo consistió en estudiar la infección natural de los limneidos colectados.

2.5 Importancia de la fasciolosis

Alrededor de 20 especies de limneidos se han descrito como hospederos intermediarios de *F. hepatica* (Dalton JP, 1999). El éxito de la amplia distribución geográfica de este trematodo probablemente se puede atribuir a su capacidad extraordinaria para adaptarse a una amplia gama de moluscos (Dalton JP, 1999; Mas-Coma, 2005). El hospedador más importante en Europa, Asia, África y Norteamérica es *Galba truncatula* (Correa et al., 2011). En Norteamérica también se han identificado *P. columella*, *L. bulimoides*, *L. humilis* y *G. cubensis*, y en Suramérica, *P. columella*, *G. cubensis*, *G. cousini*, *G. viatrix*, *G. neotropica* y *L. diaphana* (Carvalho et al., 2004; Correa et al., 2011).

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por los trematodos *Fasciola hepatica* distribuida a nivel mundial y *Fasciola gigantica* distribuida en Asia y África. Se caracteriza por una inflamación del hígado y los conductos biliares, con frecuencia de carácter crónico y acompañado de trastornos nutricionales. Esta enfermedad es considerada la parasitosis con mayor distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal, pues ha sido reportada en 51 países de África, América, Asia, Europa y Oceanía. *F. hepatica* es el único parásito capaz de originar zonas

hiperendémicas humanas desde el nivel del mar como en la Provincia de Guilán en el Mar Caspio en Irán, hasta altitudes superiores a los 3800 msnm en altiplanos y valles de Bolivia y Perú. No hay otro parásito heteroxeno que presente tan amplia distribución como *F. hepatica* (González et al., 2011; Mas-Coma, 2005; Rokni et al., 2002).

La infección de los rumiantes y otros hospedadores definitivos ocurre por vía oral. En el caso del ganado, tiene lugar durante el pastoreo, el consumo de agua o de henos y ensilados contaminados con metacercarias. Una hora después del ingreso al hospedero, la metacercaria se enquista en el intestino delgado y el parásito atraviesa la pared intestinal; pasa a la cavidad peritoneal y desde allí alcanza el hígado y al poco tiempo migra a los conductos biliares asentándose definitivamente en ellos (Cordero del Campillo, 2001).

La presencia de *F. hepatica* depende de que en el mismo nicho ecológico habiten hospedadores definitivos y moluscos limneidos, que actúan como hospedadores intermediarios en el ciclo del parásito. La presencia de los moluscos está condicionada por factores ambientales y topográficos específicos necesarios para su supervivencia y reproducción. Los hospederos definitivos como los bovinos u ovinos infectados con el parásito eliminan huevos al ambiente, y si existen condiciones adecuadas, eclosionan liberando un miracidio que debe encontrar un molusco hospedador antes de 24 horas. En el caracol, el miracidio se transforma en esporocisto joven, redia y cercaria. La cercaria emitida por el caracol se enquista a metacercaria sobre plantas acuáticas, que es la forma infectante muy resistente a condiciones adversas en el medio ambiente (Cordero del Campillo, 2001).

Estudios realizados por el PECET de la Universidad de Antioquia aportan información importante sobre la fasciolosis bovina y ovina en Colombia. En estos, se ha encontrado que afectando al 25% del ganado lechero en zonas rurales de Medellín y Rionegro (Antioquia) (Estrada et al., 2006). Por otra parte, en el departamento de Quindío se encontró una prevalencia en bovinos de 3,74% (Recalde-Reyes et al., 2014); y un estudio realizado en 2013 en Pamplona, Norte de Santander, mostró una prevalencia en bovinos de 93,75% (Palma, Ricardo, & Rozo, 2014). Otro estudio realizado por la Universidad de la Salle reveló una prevalencia de 5,6% en localidades de Cundinamarca (Cabra Angel & Herrera Huérfino, 2007) y particularmente en Santander los estudios realizados mediante serología y coprología por la Línea de Parasitología humana y veterinaria del Grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) dan cuenta de prevalencias promedio de 50% y 33% respectivamente (datos sin publicar).

La fasciolosis humana es reconocida como una enfermedad emergente y reemergente de distribución mundial. Se estima de 2,4 a 17 millones de personas afectadas y 180 millones en riesgo (Mehmood et al., 2017). En algunas regiones, la prevalencia de la infección por *F. hepatica* es extremadamente alta, sobre todo en Perú y Bolivia, donde es considerada un problema grave de salud pública con prevalencias entre el 72 y 100% en algunas localidades del altiplano boliviano (José Guillermo Esteban et al., 1997; Mas-Coma et al., 1999). En Colombia es escasa la información sobre la prevalencia de infección humana. Los pocos reportes han sido realizados a partir de estudios en poblaciones muy focalizadas y muestran prevalencias de infección por serología entre 0% y 5% (Wilches et al., 2009).

Dada la importancia que tiene la fasciolosis en algunas zonas del país y su impacto en la economía de los pequeños productores, sumando el hecho de que la diversidad de limneidos en nuestro país no ha sido estudiada detalladamente, se propuso mediante este trabajo realizar la búsqueda e identificación de las especies de limneidos presentes en Santander y Boyacá, no solo en donde se han reportado casos de fasciolosis bovina y ovina, sino también en áreas donde no se ha reportado la enfermedad.

2.6 Presentación de los departamentos de Santander y Boyacá

Colombia se divide en seis regiones naturales: Amazonía, Andina, Caribe, Insular, Orinoquía y Pacífica. La región Andina está formada por tres ramales septentrionales de la cordillera de los Andes: Occidental, Central y Oriental. Las cordilleras dan lugar a numerosos valles, cañones, mesetas y un sistema fluvial cuyos principales ríos son el Cauca y el Magdalena. La región Andina es la más poblada y económicamente más activa. Los Departamentos de Santander y Boyacá se hallan sobre la cordillera oriental.



Figura 1. Ubicación de los departamentos de Santander y Boyacá. Cundinamarca y Norte de Santander fueron muestreados parcialmente en municipios limítrofes con Santander y Boyacá.

2.6.1 Santander. El departamento de Santander está ubicado al noroeste del país, en la región andina, limitando al norte con Cesar y Norte de Santander, al este y sur con Boyacá, al oeste con Antioquia y al noroeste con Bolívar. Se halla comprendido entre los 5° 26' y 8° 08'' latitud norte, 72° 26' y 74° 32' longitud oeste, sobre la zona intertropical, cubriendo en su territorio la vertiente occidental de la Cordillera Oriental. Su altitud media es de 1230 m.s.n.m., abarcando desde los 40 m.s.n.m. en el valle del Magdalena Medio, hasta los 4513 m.s.n.m. en el Alto de la Colorada (páramo del Almorzadero) (Ministerio de Comercio, 2012).

Está conformado por 87 municipios agrupados en seis provincias: Comunera, García Rovira, Guanentá, Yariguíes, Soto y Vélez. Ocupa el cuarto lugar a nivel nacional por su importancia poblacional y económica.

Sus zonas de páramo están en el macizo montañoso conocido como Nudo de Santurbán, y lo conforman principalmente los municipios de California, Vetás, Suratá, Santa Bárbara y Tona en la provincia de Soto. Sobre la margen oriental, limitando con los departamentos de Norte de Santander y Boyacá, se encuentra el páramo Complejo Almorzadero, conformado por los municipios de San Andrés, Málaga, Cerrito, Concepción, Molagavita, entre otros, que hacen parte de la provincia García Rovira (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013).

El Nudo de Santurbán contempla una amplia región natural de ecosistema montano intertropical, y es el principal centro hidrográfico del departamento, revistiendo una gran importancia ecológica (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013).

El páramo tiene un clima frío con moderadas a abundantes precipitaciones y temperaturas mínimas por debajo de 0°C y máximas por encima de los 35°C. La humedad relativa generalmente

es superior a 83%. El régimen de precipitación es bimodal, con periodos de alta precipitación entre los meses de abril-mayo y septiembre-noviembre aproximadamente (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013).

El bosque alto andino se puede encontrar en los municipios de Gámbita, Charalá, Encino y Onzaga en la provincias Comunera y Guanentá, y en Cerrito, Guaca, Santa Bárbara, Concepción, Carcasí y Macaravita en la provincia García Rovira (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013). También se encuentran páramos en los sectores de La Rusia y Almorzadero.

Las zonas de selva y bosque andino intervenidas se encuentran en los municipios de Cimitarra, Landázuri, Santa Helena del Opón, Puerto Parra, La Belleza, Florián, Bolívar y La Paz en la provincia de Vélez.

En el área ubicada en el piedemonte santandereano se encuentra la Serranía de los Yariguíes; sus municipios más cercanos son: Socorro, Hato, Galán, Zapatoca, Chima, Contratación, El Guacamayo, Betulia, San Vicente de Chucurí, El Carmen de Chucurí y Santa Helena del Opón. En la serranía se ubica el Parque nacional natural Serranía de los Yariguíes, lugar de nacimiento de más de 60 quebradas y ríos que son afluentes del río Suárez y el río Chicamocha. Los ecosistemas que comprende son páramo, subpáramos, bosques andinos, bosques subandinos y bosques húmedos tropicales (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013; Ministerio de Comercio, 2012).

2.6.2 Boyacá. El departamento de Boyacá está ubicado en el centro-este del país, en la región andina, limitando al norte con Santander y Norte de Santander, al noreste con Venezuela y Arauca, al este con Casanare, al sur con Cundinamarca y al oeste con Caldas y Antioquia. Está comprendido entre los 04°39' y 07°03' latitud norte, 71°57' y 74°41' longitud oeste.

Boyacá presenta una diversidad de accidentes geográficos que forman las regiones fisionómicas del valle del río Magdalena, la cordillera oriental, el altiplano cundiboyacense y el piedemonte de los llanos orientales. Su altitud media es de 2427 m s. n. m. y alcanza su punto máximo de 5490 m s. n. m. en la Sierra Nevada El Cocuy (Bello, 2011; Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013).

La región del altiplano cundiboyacense alberga sus principales municipios: Tunja, Duitama y Sogamoso. Presenta una temperatura promedio de 14°C, que oscila entre 0°C y 24 °C. Las temporadas secas y lluviosas se alternan durante el año; los meses más secos van de diciembre a marzo, y los más lluviosos en abril, mayo, septiembre, octubre y noviembre. En los meses de junio, julio y agosto es mayor la oscilación de la temperatura; durante el alba se suelen presentar muy bajas temperaturas, llamadas heladas, que afectan la agricultura. También es común la presencia de lluvias de granizo. En esta región, la principal actividad económica fuera de las ciudades es la agropecuaria, destacando la ganadería lechera (Bello, 2011).

3 Objetivos de investigación

3.1 Objetivo general

Identificar por características morfológicas y moleculares las especies de la familia Lymnaeidae presentes en Santander, Boyacá, algunas localidades de Norte de Santander y Cundinamarca, y establecer las tasas de infección natural por *F. hepatica* en los individuos colectados.

3.2 Objetivos específicos

Clasificar mediante características de la concha y anatomía del aparato reproductor los caracoles recolectados.

Confirmar molecularmente la especie de cada grupo fenotípico identificado.

Determinar la prevalencia de infección por *F. hepatica* de los limneidos capturados en la región de estudio.

4 Metodología

El objetivo planteado se abordó mediante una investigación descriptiva, de tipo observacional y de corte transversal. Se realizaron muestreos entre los años 2015 y 2018 en sitios seleccionados por conveniencia. Los muestreos de 2015 y 2016 se hicieron en el marco un proyecto de Joven Investigador COLCIENCIAS por el autor de este trabajo, que sirvió de antecedente para proponer y desarrollar la presente investigación.

4.1 Muestreo de moluscos Lymnaeidae en veredas de Santander y Boyacá en diferentes pisos térmicos

Una vez revisado el contexto geográfico y ecológico de los departamentos y la situación de la fasciolosis, se preseleccionaron los municipios más idóneos para realizar los muestreos; esto es, aquellos que fueran representativos de la diversidad geográfica de Santander y Boyacá. Se escogieron algunas localidades en donde se ha reportado la presencia de fasciolosis por los productores de la región. También se tuvieron en cuenta municipios sin reporte de la enfermedad, que en caso de hallar limneidos podrían convertirse en focos potenciales.

El contacto con las Secretarías de Desarrollo Agropecuario, oficinas municipales del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, productores, veterinarios, técnicos agropecuarios e investigadores de otras universidades, permitió concretar las visitas a las veredas y fincas contando con acompañamiento de personas de la zona.

Se tuvo en cuenta que los puntos de muestreo seleccionados en cada municipio cubrieran los distintos pisos térmicos y rangos altitudinales presentes en su extensión. Se seleccionaron veredas correspondientes a altitudes bajas, medias y altas según las características del municipio.

La búsqueda y colecta de especímenes se realizó durante el día, en terrenos húmedos, caracterizados por la presencia de agua dulce y vegetación acuática. Estos puntos incluyeron cañadas o canales, quebradas o riachuelos, ríos, drenajes de carretera, campos de pastoreo encharcados o estancados, zanjas de drenaje, lagos naturales y artificiales, tanques y bebederos. Se hizo la respectiva georreferenciación y se registró la temperatura en cada punto muestreado, ya sea positivo o negativo para moluscos limneidos.

Se ubicaron los cuerpos de agua presentes en las fincas y se examinaron en busca de moluscos hasta por 30 minutos. En caso de no hallar limneidos en este tiempo, o después de haber examinado detalladamente el punto de muestreo, se procedió a buscar en otro cuerpo de agua. En el caso de quebradas, zanjas de drenaje o riachuelos, se hizo un recorrido cada diez metros hasta los límites de la finca. Se colectó un máximo de 100 limneidos por punto para su identificación y determinar la infección natural por *F. hepatica*.

Los especímenes colectados se depositaron en tubos Falcon de 50 mL y se mantuvieron vivos hasta el momento de preservarlos. Para este procedimiento, los limneidos fueron sumergidos en agua a 70°C por 1 minuto. Los cuerpos de los caracoles fueron retirados de la concha y almacenados en etanol 70%. Este procedimiento se realizó en campo y las muestras se trasladaron al Laboratorio de Parasitología de la Universidad Industrial de Santander. Una muestra se utilizó para la identificación molecular por amplificación del marcador COI del ADN mitocondrial y la

otra se mantuvo en etanol 70% para estudios morfológicos con el fin de clasificarlos mediante la anatomía del aparato reproductor.

Los moluscos colectados se identificaron inicialmente como miembros de la familia Lymnaeidae por las siguientes características: tamaño máximo de 15 mm de largo por 6 mm de ancho, concha en espiral con apertura dextrógira, ausencia de opérculo y ocelos en la base de los tentáculos.

4.2 Clasificación de limneidos por características morfológicas

Para la identificación de los limneidos, los taxónomos utilizan caracteres morfoanatómicos de la concha y del sistema reproductor, especialmente del pene, prepucio y próstata.

Durante el año 2016 se recibió orientación teórico-práctica del malacólogo Jean-Pierre Pointier para la identificación anatómica. La capacitación brindó las bases para realizar correctamente la disección, ilustración y medición de los caracteres morfoanatómicos usados en la identificación de limneidos. Jean-Pierre Pointier supervisó este proceso en los años posteriores mediante consultas por correo electrónico que incluían imágenes y descripciones de los especímenes.

Se seleccionaron algunos individuos de cada punto de muestreo conservados en etanol 70% para disección, con el fin de observar la anatomía del aparato reproductor bajo un estereoscopio; con ayuda de una cámara lúcida se realizaron dibujos del complejo peneal y próstata. Se registraron

las dimensiones de longitud y ancho de la próstata, pene y prepucio, ancho anterior y posterior de la vaina del pene y la longitud y ancho de la concha.

4.3 Confirmación de las especies de limneidos por el marcador molecular COI

4.3.1 Extracción de ADN. Se utilizó una parte del pie del caracol para la extracción del material genético. Esta muestra se suspendió en 600 µL de buffer de lisis (10 mM Tris HCl pH: 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) y 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml). Se incubó a 56°C hasta observar la digestión completa del tejido, agitando ocasionalmente. Después de la digestión, se adicionó 150 µL de NaCl 6M y se agitó por 30 segundos. Para precipitar las proteínas se incubó por 5 minutos en frío. Después se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial evitando remover el precipitado, se adicionó al sobrenadante 600 µL de Isopropanol (-20°C), se mezcló por inversión durante 1 minuto. Se centrifugó a 10000 rpm por 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 200 µL de etanol al 70%. Se centrifugó a 10000 rpm por 4 minutos y se eliminó el sobrenadante por inversión. Finalmente, se resuspendió en buffer TE 1X, pH 7.5, estéril y se incubó a 60°C por 1 hora para almacenarlo a -20°C hasta su uso. La calidad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y se cuantificó por NanoDrop (Thermo Scientific, NanoDrop 1000).

4.3.2 Amplificación del marcador COI por PCR de punto final. Se amplificó un fragmento del gen que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo C oxidasa (COI) del ADN mitocondrial. Se realizó por PCR de punto final con un volumen de reacción total de 25 µL por muestra, que incluyó: 13.6 µL de agua ultrapura estéril, 5 µL de buffer de reacción 5X, 3 µL MgCl₂

25 mM, 1 µL de mezcla de dNTPs, 1 µL de cebadores universales LCO1490 5'GGTCAACAACCTCATAAAGATATTGG 3' y HCO2198 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3', 0.4 µL de Taq ADN Polimerasa (Promega) y 2 µL ADN de los moluscos. Los ciclos de temperatura fueron los siguientes: 95°C durante 5 minutos; 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 10 segundos, 72°C durante 1 minuto y 30 segundos (se repitió por 40 ciclos) y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. Los productos amplificados se verificaron en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE. Los productos de la amplificación se enviaron a secuenciar (Correa et al., 2010, 2011).

4.3.3 Secuenciación de los amplificados. Los amplificados se enviaron a Magrogen, Inc. (Seúl, Corea del Sur), donde se secuenciaron por el kit “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” usando electroforesis capilar y un secuenciador ABI3730XL (Technology, 2007).

4.3.4 Alineamiento de secuencias. Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se analizaron con el software BioEdit para determinar su calidad. Las secuencias corregidas se sometieron a alineamiento local usando la herramienta BLAST para compararlas con aquellas incluidas en la base de datos del GenBank.

4.4 Determinación de la infección natural de los limneidos colectados

Los especímenes colectados se examinaron en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Salud de la UIS para identificar por morfología la presencia de estadios larvarios: redias y/o

cercarias de *Fasciola hepatica*, tanto en las partes blandas como en la parte interna de la concha, y metacercarias en la superficie de la concha del limneido.

4.5 Registro y análisis de datos

La información sobre los puntos de muestreo, cantidad de limneidos colectados, dimensiones de la concha, dimensiones de los órganos del aparato reproductor, identificación molecular e infección natural se registró en Excel y el software Epidata para análisis descriptivo. Los puntos de muestreo positivos y negativos para limneidos, así como las especies identificadas, se señalaron en mapas de los departamentos de Santander y Boyacá.

5 Consideraciones éticas

Este trabajo de investigación fue avalado por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander, como consta en el Acta N.07 del 27 de abril de 2018.

Las consideraciones éticas fueron redactadas teniendo en cuenta las guías del CEINCI de la UIS, específicamente la “Guía consideraciones éticas animales” y “Guía consideraciones éticas sustancias químicas y medio ambiente”.

De acuerdo con los principios establecidos en la norma nacional, en el Capítulo VI de la Ley 84 de 1989 “Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia”; el Decreto 1375 de 2013 “Por el cual se reglamentan las colecciones biológicas”, el Decreto 1376 de 2013 “Por el

cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial”, el Decreto-Ley 2811 de 1974 “Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovable y Protección al Medio Ambiente”, el PGIR de la Universidad Industrial de Santander, y según el título V de la Resolución 8430 de octubre 4 de 1993 “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, y en cumplimiento con los aspectos mencionados en los artículos 87, 88, 89, 92 y 93 de la presente resolución, este estudio se desarrolló conforme a los siguientes criterios:

- Este proyecto se llevó a cabo cuando se obtuvo la aprobación de los entes reglamentarios, como el Comité de Ética para la Investigación Científica (CIENCI) de la Universidad Industrial de Santander.
- El permiso de colecta de los animales fue el “Permiso marco de recolección de especímenes de la biodiversidad” otorgado por el ANLA a la Universidad Industrial de Santander por medio de la Resolución 47 de 2015, en donde está incluido el grupo de investigación GIEM.
- Aun cuando la manipulación y procesos con los animales (por parte de los investigadores y personal que participe del proyecto) reviste Riesgo mínimo, se siguieron todas las Normas de Bioseguridad establecidas para estos procedimientos, lo mismo que el descarte de residuos biológicos y químicos generados de acuerdo a los lineamientos del PGIR de la UIS.
- Los animales recolectados y utilizados para el estudio se trataron con las Normas de Bioseguridad, con todos los cuidados y consideraciones que requieren el buen trato del animal, siendo realizados estos procedimientos por personal idóneo.

- Solamente se utilizó el mínimo número de animales requerido para obtener resultados científicamente válidos, que pudo ser de tan solo un individuo. Esto pudo ocurrir en el caso de encontrar un único espécimen en el punto de muestreo y, siempre y cuando haya sido posible realizar identificación anatómica y molecular. Si en un punto de muestreo se hallaron numerosos especímenes, se analizaron todos los colectados en un tiempo de 20 minutos para buscar estadios larvarios de *F. hepatica*.

- Una muestra de los limneidos colectados, luego de ser identificados y clasificados taxonómicamente, fueron depositados en la Colección Biológica N.42 “Museo de Historia Natural” de la Universidad Industrial de Santander, perteneciente al Registro Nacional de Colecciones Biológicas del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. La solicitud de ingreso de especímenes de macroinvertebrados fue aprobada por la directora de la Escuela de Biología y encargada de la Colección Limnológica, Maria Isabel Criales, y la curadora del MHN-UIS, la profesora Martha Patricia Ramírez.

- Los investigadores y demás personal trataron a los animales como seres sensibles y consideraron como un imperativo ético el cuidado y uso apropiado, evitando que se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero. Se garantizó buen trato a los animales según lo dispuesto en la Ley 84 de 1989, el Título V de la Resolución 8430 y los decretos 1375 y 1376 de 2013.

- No se realizaron procedimientos quirúrgicos o dolorosos en animales no anestesiados, paralizados por agentes químicos.

- En este estudio no se incluye el diligenciamiento del “Consentimiento informado” porque el proyecto no contempla la participación de seres humanos.

- Tanto el maestrando como las demás personas que participaron del proyecto, tienen experiencia en el desarrollo de la investigación y de los diferentes procedimientos que ella amerita.
- Si los especímenes colectados se encuentran infectados naturalmente con *F. hepatica*, su recolección e identificación puede generar un beneficio directo tanto a las personas de la región como a su ganado bovino y ovino, pues se alertará sobre la presencia del parásito y se pueden proponer medidas para evitar la infección.
- Este estudio no generó impacto o riesgo para los demás seres vivos o el ambiente que forma parte del ecosistema donde se colecten los animales, pues solo se hizo una sola colecta por punto y de una cantidad de individuos que no vulnera el equilibrio del ecosistema.
- Los procedimientos de biología molecular que requieren el uso de sustancias químicas, así como el descarte de residuos fue realizado por personal capacitado implementando todas las medidas de bioseguridad para el trabajo de laboratorio dispuestas por la Escuela de Microbiología, el Grupo GIEM y el PGIR de la UIS.

6 Cronograma

Las actividades se llevaron a cabo de acuerdo al cronograma propuesto para el año 2018 presentado a continuación (Tabla 1):

Tabla 1.
Cronograma propuesto para el año 2018.

Actividad	Tiempo (meses)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Definición de los sitios de muestreo	X											
Salidas de campo para colecta de limneidos		X	X	X	X							
Puesta a punto de procedimientos de laboratorio			X	X	X							
Determinación de especies por características anatómicas				X	X	X						
Identificación de especies por marcador molecular					X	X	X	X	X			
Redacción de trabajo de grado						X	X	X	X	X		
Cumplimiento de requisitos para grado										X	X	X

7 Presupuesto

La Línea de Parasitología humana y veterinaria del GIEM contó con los equipos, materiales y reactivos necesarios para las salidas de campo y el trabajo de laboratorio necesarios para ejecutar la investigación.

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud. Se dispuso de reactivos para extracción de ADN y PCR, así como el material de

laboratorio necesario. Los costos asociados a las salidas de campo y las secuenciaciones fueron cubiertos con recursos del Semillero de la Línea de investigación.

Para los muestreos y procedimientos desarrollados durante 2015 y 2016, se contó con beca de COLCIENCIAS del programa Jóvenes Investigadores e Innovadores. La Tabla 2 presenta una estimación de los costos del proyecto:

Tabla 2.
Presupuesto estimado de la investigación.

PRESUPUESTO GLOBAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN			
ÍTEM	RUBRO	VALOR (COP)	UIS ESPECIE
1	Salidas de campo	2'000.000	
2	Materiales e insumos para salidas de campo	1'000.000	
3	Reactivos y material biología molecular	8'000.000	
4	Servicio técnico (Secuenciación)	1'000.000	
5	Equipos		10'000.000
6	Eventos académicos	1'000.000	
7	Publicaciones	500.000	
8	Personal científico		31'200.000
	Total (pesos)	13'500.000	39'200.000
		52'700.000	

8 Resultados y discusión

8.1 Muestreo de moluscos Lymnaeidae

Se realizaron 25 salidas de campo entre 2015 y 2018, visitando un total de 117 puntos georreferenciados en 25 municipios de cuatro departamentos. Se registró la fecha de muestreo,

provincia, vereda, nombre de la finca o zona, coordenadas, altitud, temperatura ambiental, tipo de hábitat, presencia o ausencia de limneidos, número de limneidos colectados, y presencia o ausencia de otras especies de caracoles. La información detallada de cada muestreo se encuentra en los anexos 1 y 2. En la Tabla 3 se resumen los puntos muestreados:

Tabla 3.
Muestreos realizados entre 2015 y 2018.

N	Municipio	Localidad	Coordenadas	Altitud (m.s.n.m.)	Limneidos colectados
SANTANDER					
1	El Playón	Parador del Motorista	7°26'9,25"N 73°11'37,5"O	525	0
2	El Playón	Corr. San Pedro de la Tigua	7°28'58,8"N 73°4'34,4"O	856	0
3	El Playón	Barrio Nuevo	7°34'36"N 73°14'8,2"O	642	0
4	Rionegro	Florencia	7°21'11,6"N 73°10'28"O	590	0
5	Rionegro	La Chapa	7°23'31,2"N 73°10'51,8"O	583	0
6	Rionegro	El Portal	7°15'51"N 73°08'58"O	590	0
7	Lebrija	La Angula	7°5'20,4"N 73°13'47,6"O	1033	0
8	Lebrija	Represa La Angula	7°6'34,8"N 73°13'38,9"O	1012	0
9	Lebrija	Portugal	7°9'26,9"N 73°16'53,4"O	1081	2
10	Sabana de Torres	Finca de Jairo	7°21'21,5"N 73°29'14,6"O	145	0
11	Sabana de Torres	Finca de Palma	7°22'28,8"N 73°29'14,6"O	138	0
12	Sabana de Torres	Villa Luz	7°21'4,4"N 73°28'14,7"O	141	0
13	Sabana de Torres	Finca de Jorge Amaya	7°24'37,7"N 73°28'52,4"O	126	0

14	Sabana de Torres	Villa Luz	7°24'47.1"N 73°28'18.31"O	127	0
15	Sabana de Torres	Puente Río Lebrija	7°25'42"N 73°25'56.1"O	131	0
16	Sabana de Torres	Tienda	7°27'00"N 73°25'19.7"O	133	0
17	Sabana de Torres	Hacienda Isabela	7°21'45.1"N 73°29'42.7"O	149	0
18	Sabana de Torres	Hacienda Isabela	7°21'52.9"N 73°29'26.3"O	145	0
19	Vetas	La Vega	7°20'38.2"N 72°51'37.4"O	3775	3
20	Vetas	Pirineos	7°20'38.2"N 72°51'37.4"O	3775	3
21	Vetas	Pirineos	7°20'20.9"N 72°51'20.5"O	3776	1
22	Vetas	Pirineos	7°20'20.4"N 72°51'20.5"O	3776	>100
23	Vetas	Laguna Pajarito	7°19'58.9"N 72°50'46.5"O	3789	0
24	Vetas	Laguna Las Calles	7°14'51.7"N 72°51'42"O	3821	0
25	Vetas	Laguna Potrerito	7°20'12.7"N 72°50'58.5"O	3867	10
26	Vetas	Laguna La Negra	7°20'23,3"N 72°50'48.5"O	3870	0
27	Tona	El Cairo	7°12'13,9"N 72°50'43,7"O	3377	10
28	Tona	El Hatico	7°13'40,1"N 72°50'9,7"O	3394	0
29	Piedecuesta	Km 71	6°56'18,8"N 73°1'19,9"O	1130	2
30	Piedecuesta	Km 77	6°58'15,6"N 73°2'36,1"O	1016	2
31	Zapatoca	Hotel Sindamanoy	6°48'54"N 73°16'06"O	1720	48
32	San Vicente de Chucurí	La Fortuna	6°54'18.55"N 73°27'16.73"O	810	0

33	San Vicente de Chucurí	La Mara	6°54'32.00''N 73°27'13.64''O	845	0
34	San Vicente de Chucurí	-	6°52'52.67''N 73°24'36.50''O	651	0
35	San Vicente de Chucurí	Lo Mío	6°54'07.77''N 73°27'11.30''O	765	0
36	Páramo	Juan Curí	6°22'20.54''N 73° 9'53.43''O	1217	5
37	Mogotes	Río Mogoticos	6°28'39.5''N 72°58'6.9''O	1825	0
38	Mogotes	Río Mogoticos	6°27'10.7''N 72°56'31.2''O	1819	0
39	Mogotes	Río Mogotico	6°27'13''N 72°56'12.9''O	1882	0
40	Mogotes	El cerezo	6°27'4.2''N 72°55'59.9''O	1921	0
41	Mogotes	Quebrada	6°26'34.4''N 72°55'6.2''O	2075	0
42	Mogotes	Km 46 Alto de los cacaos	6°26'10.5''N 72°53'42''O	2283	0
43	Mogotes	Túbuga	6°28'30.8''N 72°58'53.8''O	1828	0
44	Mogotes	Guayaguata	6°29'29.19''N 72°59'7.7''O	1828	0
45	Encino	-	6°8'15,5''N 73°5'59,8''O	1870	0
46	Encino	Primavera	6°6'57,7''N 73°5'59,8''O	1520	0
47	Encino	Medios Ríos	6°8'1,3''N 73°6'42,8''O	1725	0
48	Encino	San Benito	6°7'37,4''N 73°5'9,3''O	1950	0
49	Encino	Casa de teja	6°2'46,8''N 73°2'4''O	2761	20
50	Encino	El Olvido	6°2'40''N 73°2'0''O	2782	0
51	Encino	Villa Nueva	6°2'44''N 73°2'8,8''O	2834	0
52	Encino	El Vergel	6°2'45,3''N	2789	8

			73°2'9"O		
53	Encino	Manzano (Rancho quemado)	6°2'42,2"N 73°1'58"O	2796	>30
54	Encino	El Moral	6°2'40"N 73°1'50"O	2803	17
55	Encino	La Manga	6°2'36,2"N 73°2'0"O	2786	0
56	Encino	Casa de teja	6°2'46,8"N 73°2'4"O	2789	>100
57	Encino	Balconcitos	6° 3'56.92"N 73° 2'45.40"O	2653	0
58	Encino	El Recuerdo	6° 3'53.21"N 73° 2'48.24"O	2619	0
59	Encino	Novaire (El Localito)	6° 4'40.66"N 73° 3'27.75"O	2140	22
60	Encino	Casanare	6° 4'12.35"N 73° 3'6.69"O	2218	0
61	Encino	El Espino	6° 4'1.61"N 73° 3'0.61"O	2391	26
62	Encino	El Guayabo	6° 4'5.25"N 73° 3'4.82"O	2279	26
63	Onzaga	La Esmeralda	06°16'30,1"N 72°49'54,1"O	2415	94
64	Onzaga	Siachía	06°20'39,4"N 72°47'33,8"O	2067	41
65	Onzaga	La Garrocha	06°15'45,9"N 72°49'57,9"O	2358	86
66	Onzaga	El Golfo	06°16'15,0"N 72°47'20,4"O	2417	130
67	Onzaga	La Arrinconada	06°09'16,1"N 72°50'27,6"O	3226	7
68	Onzaga	Santo Domingo	06°18'49,0"N 72°49'40,3" O	2092	130
69	Onzaga	La Esmeralda	06°09'47,2"N 72°50'08,6"O	3154	15
70	Onzaga	Mogoticos	06°14'40,6"N 72°46'50,1"O	2754	131
71	Onzaga	El Pino	6°19'27.3"N 72°48'32.5"O	2162	0

72	Onzaga	El Pino	6°19'21.7"N 72°48'37.2"O	2164	0
73	Onzaga	Escuela veredal	6°18'18.4"N 72°47'54.1"O	2351	67
74	Onzaga	Sector Dos pisos	6°17'24.8"N 72°47'46.5"O	2440	12
75	Onzaga	Mogoticos	6°16'4.1"N 72°47'12.9"O	2637	0
76	Barbosa	Quebrada El Tablón	5°56'56.71"N 73°37'19.34"O	1700	5
77	Barbosa	Paraíso	5°56'2.55"N 73°36'40.83"O	1566	2
78	Barbosa	Río Suárez (Piedra de pato)	5°55'2.92"N 73°37'33.01"O	1538	0
79	Barbosa	Barrio La Verónica	5°55'25.06"N 73°37'29.23"O	1540	0
80	Cerrito	La Fortuna	6°54'14.14"N 72°42'11.12"O	3178	12
81	Molagavita	Sector El Cedro	6°39'38.4"N 72°46'29.5"O	2943	33
82	Molagavita	Villegas	6°40'12.0"N 72°47'57.8"O	2099	10
BOYACÁ					
1	Moniquirá	Villa Andrea	5°55'18.19"N 73°36'3.31"O	1600	0
2	Moniquirá	Río Moniquirá	5°55'23.15"N 73°35'52.26"O	1600	3
3	Moniquirá	Cascada	5°55'24.25"N 73°37'4.84"O	1538	0
4	Moniquirá	Pozo lizo	5°55'21.86"N 73°37'1.56"O	1550	0
5	Sotaquirá	El Recuerdo	5°44'13.69"N 73°20'57.82"O	3018	0
6	Sotaquirá	Ojo de Agua	5°44'36.25"N 73°19'32.50"O	3035	0
7	Sotaquirá	Pozo Azul	5°44'57.48"N 73°18'11.68"O	3022	0
8	Sotaquirá	El Millón	5°45'41.33"N 73°16'42.71"O	2876	178

9	Sotaquirá	Alsacia	5°45'23.58"N 73°16'25.70"O	2790	7
10	Sotaquirá	La Laja	5°45'42.17"N 73°14'22.59"O	2640	0
11	Sotaquirá	La Argelia	5°45'5.43"N 73°14'20.32"O	2600	0
12	Sotaquirá	Corinto	5°44'56.15"N 73°13'53.37"O	2570	21
13	Sotaquirá	Balmoral	5°44'37.66"N 73°14'17.61"O	2556	24
14	Duitama	La Misión	6°0'48,4"N 73°2'222"O	2833	0
15	Duitama	Las Lomitas	6°0'48,4"N 73°2'222"O	2769	0
16	Duitama	La Vega	6°0'48,4"N 73°2'222"O	2700	0
17	Belén	Buenavista	6°6'264"N 73°1'311"O	2946	1
18	Belén	La Meseta	6°1'272"N 73°1'129"O	3027	0
19	Belén	El Alisal	6°0,9"N 73°1'152"O	2994	>100
20	Belén	El Terreno	6°3,889' 'N 73°2'67"O	2910	30
21	Belén	La Tomita	6°3,889' N 73°2'69"O	2850	10
22	Belén	El Roque	6° 0'20.03"N 72°55'36.20"O	2865	5
23	Belén	Finca Ángel Hernández	6° 0'51.26"N 72°56'0.28"O	3025	2
24	Belén	Los Pinos	6° 0'43.41"N 72°56'20.76"O	3062	0
25	Belén	El Guirre	6° 1'12.56"N 72°56'12.43"O	3177	0
26	Belén	Miralindo	6° 1'4.52"N 72°56'7.53"O	3039	0
27	Tota	Playa Blanca (Laguna de Tota)	5°30'30.42"N 72°58'2.51"O	3032	0
NORTE DE SANTANDER					

1	La Esperanza	Tres Piedras	7°33'35,5"N 73°17'46,3"O	336	0
2	Mutiscua	Km 86 vía Pamplona	7°15'21,7"N 72°46'14,6"O	3295	0
3	Mutiscua	La paradita	7°17'34"N 72°44'35,8"O	2902	10
4	Mutiscua	El Helechal	7°18'51.05"N 72°43'57.16"O	2900	69
5	Mutiscua	La paradita baja	7°17'53"N 72°44'16,41"O	2857	30
6	Pamplona	Km 1 Vía Pamplona-Cúcuta	7°22'38.81"N 72°37'55.39"O	2182	2
CUNDINAMARCA					
1	Zipacón	La Tierra	4°42'52.88"N 74°24'44.79"O	1630	2
2	Zipacón	La Tierra	4°42'52.88"N 74°24'44.79"O	1630	3

Muestreos realizados en Santander, Boyacá, Norte de Santander y Cundinamarca. En color oscuro se resaltan los 48 puntos (de 117) donde se hallaron limneidos.

8.1.1 Muestreo en Santander. En el departamento de Santander se visitaron 16 municipios de cinco provincias y se muestrearon 82 puntos georreferenciados en altitudes comprendidas entre los 126 m.s.n.m. y 3870 m.s.n.m. El muestreo en este departamento significó el 70% del trabajo. Figura 2, Anexo 3.

El mayor muestreo se realizó en la provincia de Soto, con un total de 7 municipios visitados (43.7% departamental) y 30 puntos muestreados (36.5% departamental). En esta provincia se muestreó el rango altitudinal más amplio, desde 126 m.s.n.m. en Sabana de Torres, hasta 3870 m.s.n.m. en Vetás. Los municipios de Soto visitados poseen gran diversidad en su geografía regional abarcando desde el valle del Magdalena Medio hasta el ecosistema de Páramo en la zona de Santurbán de Vetás. En el Magdalena Medio se muestrearon fuentes de agua natural y artificial,

principalmente asociadas a fincas ganaderas. El Páramo de Santurbán fue el único lugar donde se buscaron limneidos en lagunas a más de 3500 m.s.n.m.

El muestreo en la provincia Yariguíes comprendió los municipios de Zapatoca y San Vicente de Chucurí. El primero se halla en un valle a 1737 m.s.n.m. al este de la Serranía de los Yariguíes y es el único municipio de la provincia que no se encuentra en el Magdalena Medio. Por su parte, San Vicente de Chucurí posee el rango altitudinal más amplio de la provincia, desde los 80 m.s.n.m. en límites con Barrancabermeja, hasta los 2600 m.s.n.m. en la Serranía de los Yariguíes. En general, presenta climas cálidos con temperaturas entre 20°C y 30°C. Los hábitats estudiados fueron principalmente ríos y quebradas.

En la provincia Guantán se abarcaron altitudes entre 1217 m.s.n.m. y 3226 m.s.n.m. El ecosistema muestreado corresponde en su totalidad a bosque andino y altoandino, con regiones de mucha humedad y niebla. Las zonas más bajas se ubicaron en Páramo y Mogotes, y las más altas en Onzaga y Encino. Se buscaron limneidos en fuentes de agua natural y artificial como ríos, quebradas, drenajes, pozos naturales y artificiales, tanques, aljibes, bebederos y campos encharcados en fincas ganaderas. En los municipios de Onzaga y Encino, el grupo GIEM ha realizado estudios epidemiológicos de fasciolosis animal y humana (65, datos sin publicar).

Barbosa fue elegido por ser un municipio representativo de los ecosistemas presentes en las provincias Vélez y Comunera, considerando que se había muestreado parte del Magdalena Medio en las provincias de Yariguíes y Soto. La región muestreada corresponde a un bosque tropical seco

con temperatura promedio de 22.4 °C. Se buscó limneidos en ríos, quebradas, bebederos, tanques y pozos de fincas ganaderas.

En la provincia de García Rovira se ubican zonas de bosque andino, altoandino y Páramo. Cuenta con un mediano sector ganadero donde el grupo GIEM ha realizado estudios epidemiológicos de fasciolosis animal y humana (78, datos sin publicar).

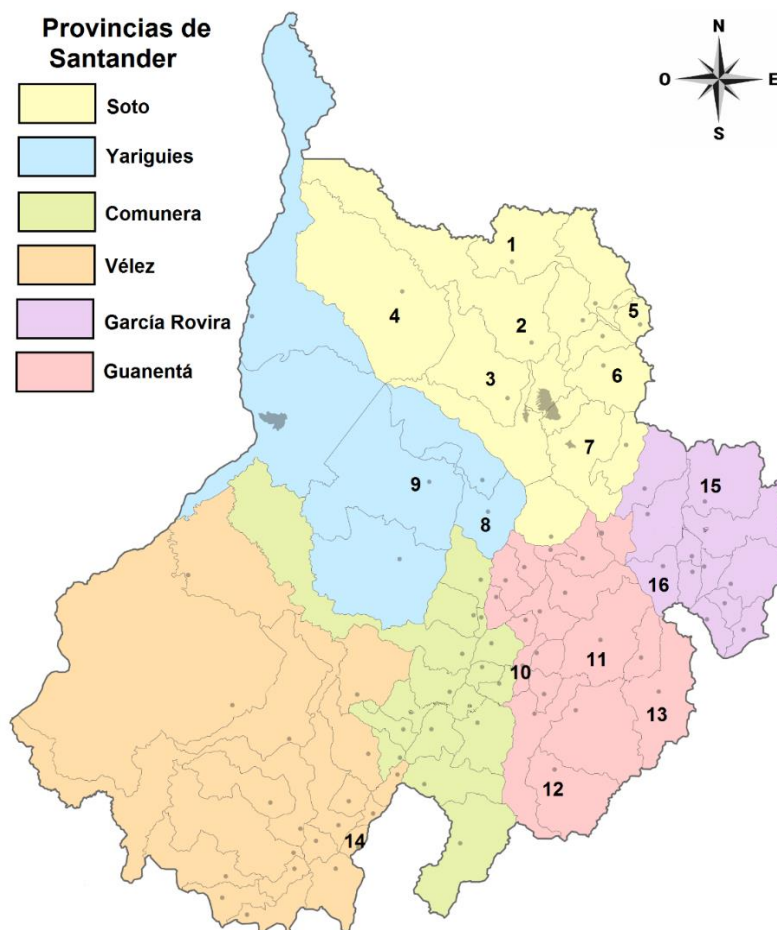


Figura 2. Municipios muestreados en el Departamento de Santander: 1. El Playón, 2. Rionegro, 3. Lebrija, 4. Sabana de Torres, 5. Vetas, 6. Tona, 7. Piedecuesta, 8. Zapatoca, 9. San Vicente de Chucurí, 10. Páramo, 11. Mogotes, 12. Encino, 13. Onzaga, 14. Barbosa, 15. Cerrito, 16. Molagavita.

8.1.2 Muestreo en Boyacá. En el departamento de Boyacá se visitaron 5 municipios de cuatro provincias sobre las regiones de la cordillera oriental y el altiplano cundiboyacense. Se muestrearon 27 puntos georreferenciados en altitudes comprendidas entre los 1538 m.s.n.m. y 3035 m.s.n.m. El muestreo en este departamento representó el 23% del total. Figura 3, Anexo 3.

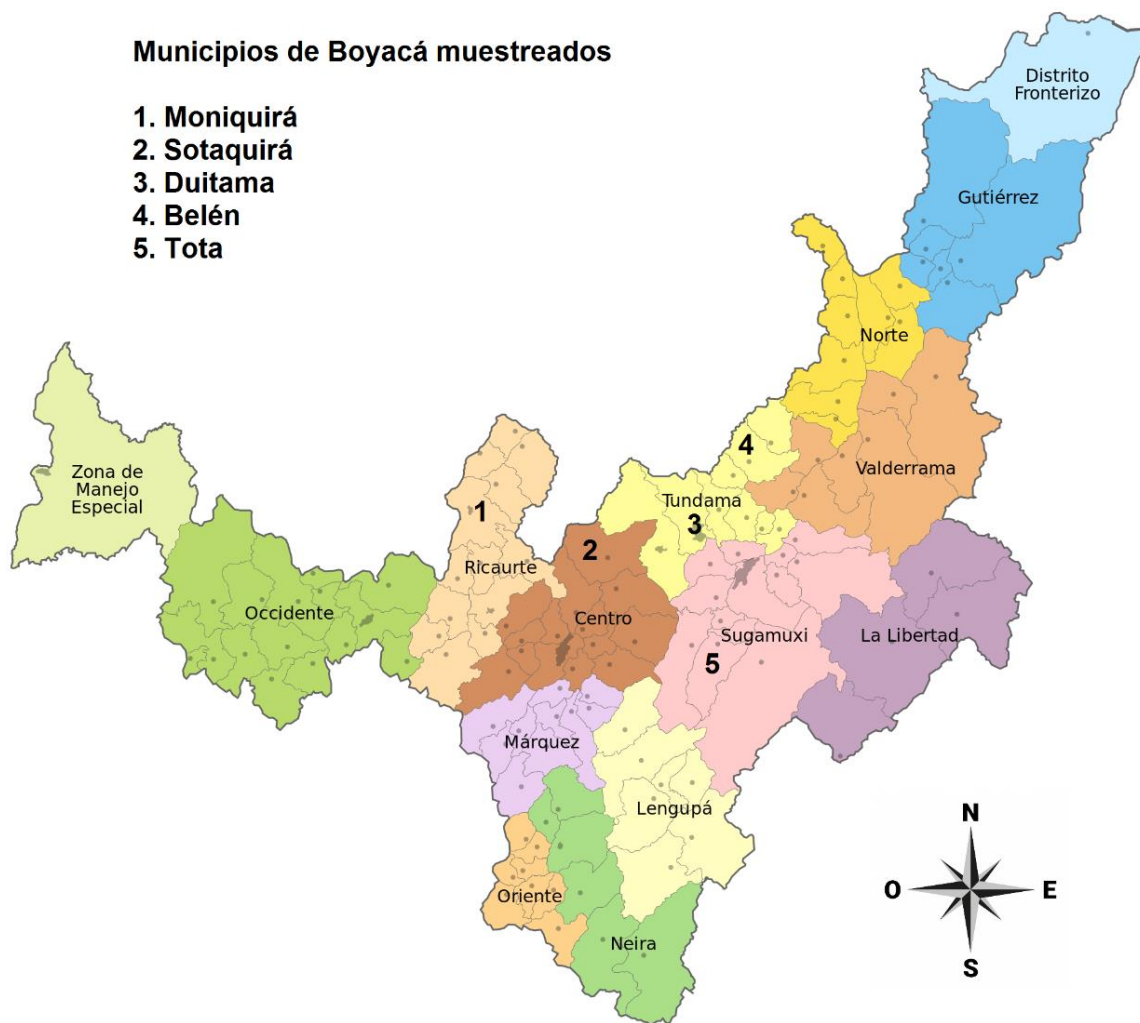


Figura 3. Municipios muestreados en el departamento de Boyacá. Moniquirá se encuentra fuera de la región del altiplano cundiboyacense, al cual pertenecen Sotaquirá, Duitama, Belén y Tota. Los colores y nombres indican las 15 provincias del departamento.

Los municipios Sotaquirá y Belén son reconocidos como centros productores de leche a nivel nacional; Moniquirá, Duitama y Tota, se destacan como productores de carne y lana dentro del departamento. Las zonas visitadas corresponden a bosque andino, altoandino y Páramo. Las fuentes de agua examinadas fueron tanto naturales como artificiales, e incluyeron ríos, quebradas, drenajes, acequias, aljibes, pozos de piscicultura, lagos, caños, tanques, bebederos, pocetas domésticas, campos de cultivo, y potreros.

8.1.3 Muestreo en municipios limítrofes. Para complementar el muestreo se escogieron municipios limítrofes a la provincia de Soto, en el departamento de Santander, que tuvieran altitudes bajas, medias y altas. El municipio de La Esperanza limita al sur con El Playón en Santander, donde se examinó un punto a 336 m.s.n.m. En la zona cercana al Páramo de Santurbán se buscaron limneidos en cuatro puntos de Mutiscua, entre 2857 m.s.n.m. y 3295 m.s.n.m. en un recorrido que finalizó en Pamplona, con un punto a 2182 m.s.n.m. Los ecosistemas y fuentes hídricas observadas fueron similares a las encontradas en los municipios limítrofes en Santander. Figura 4.

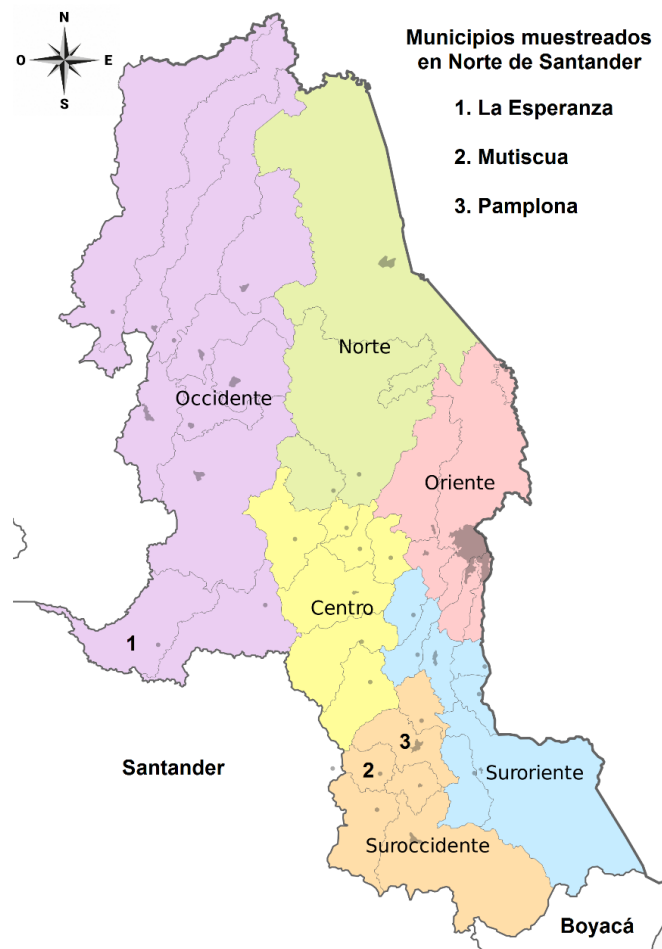


Figura 4. Municipios muestreados en el departamento de Norte de Santander. Los colores y nombres indican las regiones en las cuales se divide el departamento. La región Suroccidente también es conocida como la provincia de Pamplona, y la región Occidente como provincia de Ocaña.

Se tuvo la oportunidad de muestrear un punto localizado a 1630 m.s.n.m. en el municipio de Zipacón, en el departamento de Cundinamarca. Zipacón se ubica en la provincia Sabana Occidente, y hace parte del altiplano cundiboyacense. Figura 5.



Figura 5. Localización del municipio de Zipacón en departamento de Cundinamarca (Círculo rojo). Los colores y nombres indican las provincias del Cundinamarca.

8.2 Clasificación morfológica de limneidos

Se colectaron 1607 especímenes y todos fueron examinados para identificación morfológica de la concha. Las características de la concha fueron suficientes para diferenciar las especies *Galba cousini* y *Pseudosuccinea columella*, o para ubicarlos dentro del género *Galba* sp. apoyándose en la correlación con la altitud y hábitat donde fueron hallados. Se realizó disección de 25 individuos provenientes de 46 puntos de muestreo de 15 municipios. Los especímenes colectados en Zipacón

y *Molagavita* no pudieron ser sometidos a disección debido a su reducido tamaño, de modo que su identificación morfológica se hizo a partir de la concha. Se analizó la anatomía interna de 25 individuos porque en los puntos de muestreo cercanos entre sí solo se tuvieron en cuenta para disección aquellos individuos que pertenecieran a grupos fenotípicos distintos, dadas las características de la concha. La Figura 6 resume en imágenes el proceso de disección.

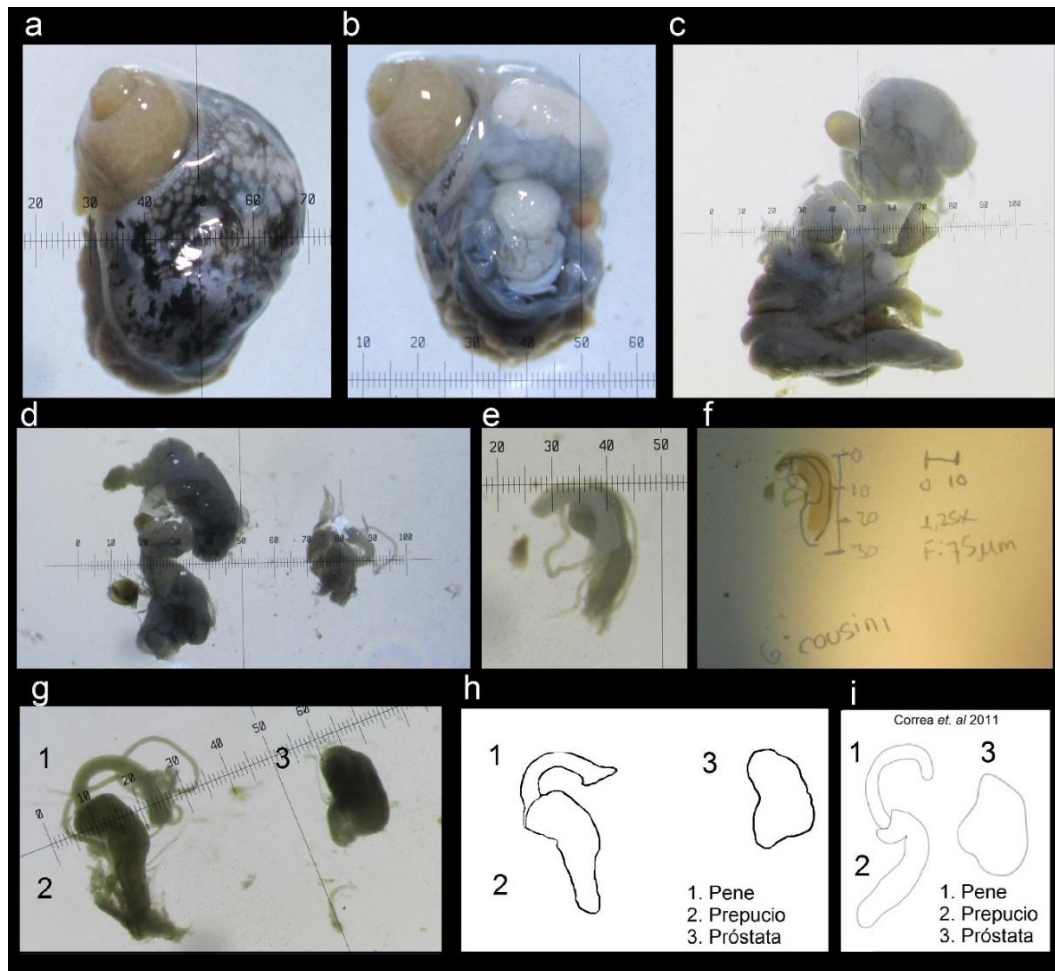


Figura 6. Proceso de disección en un espécimen de *Galba cousini* colectado en Belén (Boyacá). a. posicionamiento con vista dorsal; b. remoción del manto; c. extracción del aparato reproductor; d. separación y posicionamiento de los órganos del sistema reproductor; e. detalle del complejo peneal; f. ilustración con ayuda de cámara lúcida y mediciones con micrómetro; g. separación del complejo peneal y próstata; h. ilustración del complejo peneal próstata; i. comparación con ilustraciones de Correa *et al.* 2011.

8.2.1. *Galba cousini* (Jousseau, 1887). (*Lymnaea cousini*, Jousseau, 1887). Su localidad tipo se encuentra en Chanchu-Yacu, Chilloallo, Quito, Ecuador (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Se ha reportado en los andes de Colombia, Ecuador y Venezuela (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014), en un rango de altitud entre 2031 m.s.n.m. y 4193 m.s.n.m. (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014; Uribe et al., 2017), siendo el grande limneido más frecuente por encima de 2000 m.s.n.m. en los bosques altoandinos y páramos.

La concha de los especímenes colectados varió entre 3-17 mm de alto, y 1.5-9 mm de ancho, y presentaron las características típicas descritas para esta especie: abertura grande oblongo-ovalada que ocupa más de la mitad de la altura de la concha, espiral corta redondeada y separada por una comisura profunda, y ombligo cerrado. Figura 7.



Figura 7. Galba cousini. 1: Alisal, Belén (Boyacá) 17x9 mm (alto por ancho). 2: El Terreno, Belén (Boyacá) 10x6 mm. 3: Alisal, Belén (Boyacá) 6x4 mm. 4: Escuela Veredal, Onzaga (Santander) 3x2 mm. 5: La Garrocha, Onzaga, (Santander) 6. El Espino, Encino (Santander) 12x8 mm.

La ultraestructura de la concha revela estrías de crecimiento axial y ninguna ornamentación.

Figura 8.

La anatomía interna de esta especie es característica y permite diferenciarla de otros limneidos; presenta tubo renal con dos flexiones; próstata con apariencia granular, voluminosa y oblonga con una fisura oblicua; complejo peneal grande con vaina del pene un poco más larga que el prepucio; espermiducto más estrecho y corto que la próstata; (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Figura 9.

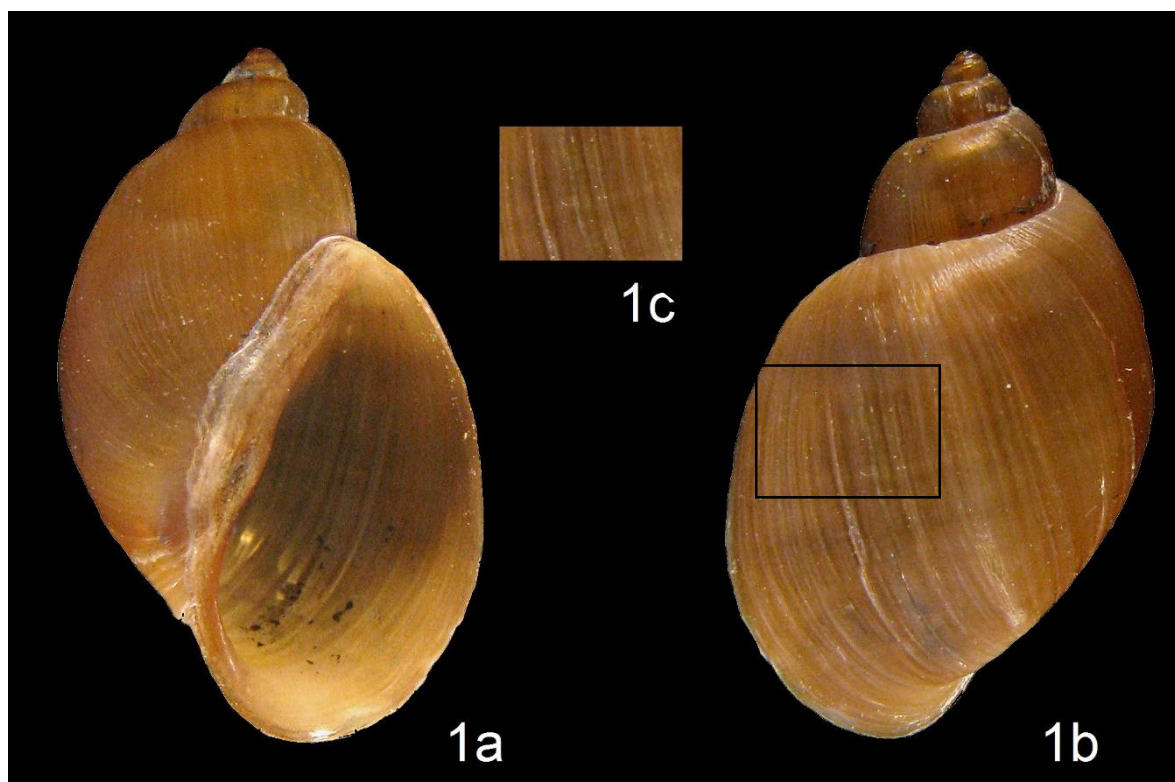


Figura 8. Ultraestructura de la concha de *Galba cousini*. La Garrocha, Onzaga (Santander). 11 mm de altura. 1a. aspecto frontal. 1b. aspecto dorsal. 1c. detalle de las estrías de crecimiento axial de la concha.

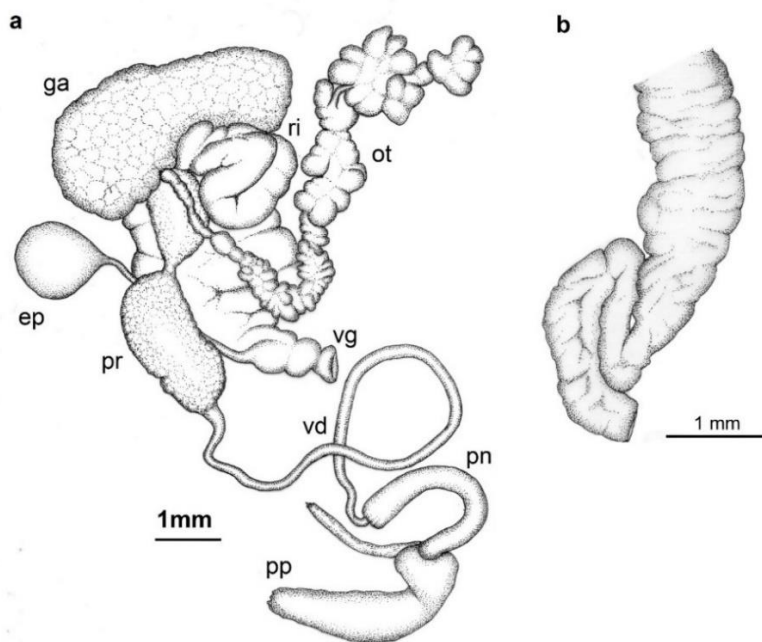


Figura 9. Anatomía de sistema reproductor de *Galba cousini*. a. Espécimen de Tona (Santander). ga: glándula albuminar; ri: riñón; ep: espermateca; pr: próstata; ot: ovotestis; vg: vagina; vd: vaso deferente; pn: pene; pp: prepucio. b. morfología del riñón con dos flexiones. Ilustraciones de Jean-Pierre Pointier.

8.2.2. *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817). (*Lymnaea columella*, Say, 1817). Su localidad tipo se sitúa probablemente en Philadelphia, Estados Unidos. Posee distribución mundial y ha sido introducida en Sudamérica y el caribe con reportes desde México hasta Argentina (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Esta especie fue la más frecuente por debajo de los 2000 m.s.n.m.

La concha de *P. columella* es de color marrón con una espiral final grande, la abertura es oblongo-ovalada, la trenza columelar está ligeramente torcida y el labio interno cubre más o menos la columela. El perióstraco presenta microesculturas axiales y espirales (Jean-Pierre Pointier &

Alarcón de Noya, 2014). Las dimensiones de las conchas variaron entre 6-14 mm de alto y 2-4 mm de ancho. Figura 10.

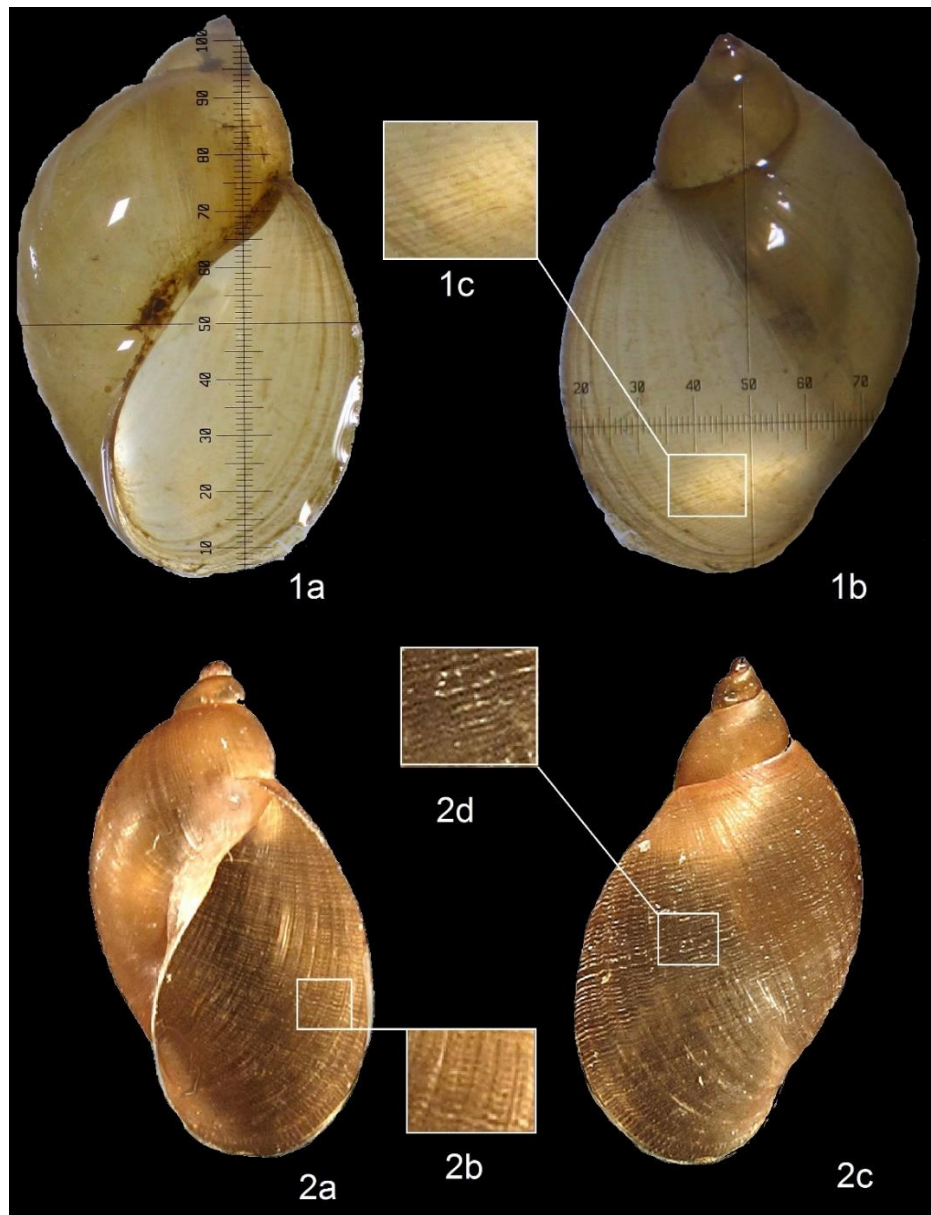


Figura 10. *Pseudosuccinea columella*. 1. Páramo (Santander) 12x8 mm (alto por ancho). 1c. detalle microesculturas axiales y espirales del perióstraco. 2. Zapatoca (Santander) 9.3 mm de alto. 2b y 2d: microesculturas del perióstraco.

La anatomía interna de *P. columella* presenta patrones característicos (Paraense, 1983), destacando un oviducto masivo, complejo peneal pequeño con vaina del pene corta y prepucio largo y delgado; próstata angosta y poco desarrollada que no se diferencia bien del espermiducto; tubo renal con dos flexiones (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Figura 11.

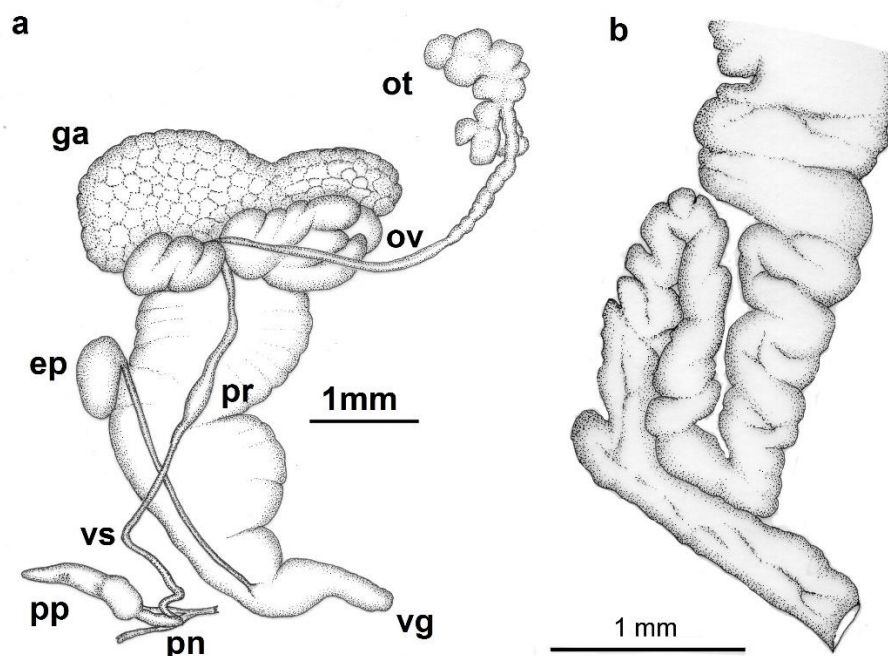


Figura 11. Anatomía de sistema reproductor de *Pseudosuccinea columella*. a. Espécimen de Santander. ga: glándula albuminar; ep: espermateca; pr: próstata; ot: ovotestis; ov: oviducto; vg: vagina; vs: vesícula seminal; pn: pene; pp: prepucio. b. morfología del riñón con dos flexiones. Ilustraciones de Jean-Pierre Pointier.

8.2.3. *Galba truncatula* (O.F. Müller, 1774). (*Buccinum truncatulum* O.F. Müller, 1774). Su localidad tipo es cerca de Weimar, Turingia, Alemania. Es el primer pequeño limneido descrito.

Tradicionalmente se ha considerado nativo de Europa, sin embargo, los estudios filogenéticos realizados por Correa, *et al.* (2010) la ubican en el clado americano. Es una especie invasora presente en la Cordillera de los Andes desde Chile y Argentina hasta Venezuela (Correa *et al.*, 2010; Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

La concha de *G. truncatula* es indistinguible de otras especies como *G. cubensis*, *G. neotropica* o *G. schirazensis*. La concha es de color claro, amarillenta o pardusca con 5 o 6 vueltas de la espiral separadas claramente. Las dimensiones de los especímenes colectados variaron entre 3-11 mm de alto, y 1.8-4 mm de ancho. La apertura es ovalada con una altura menor a la mitad de la altura de la concha. Se observan estrías de crecimiento variables. Figura 12.

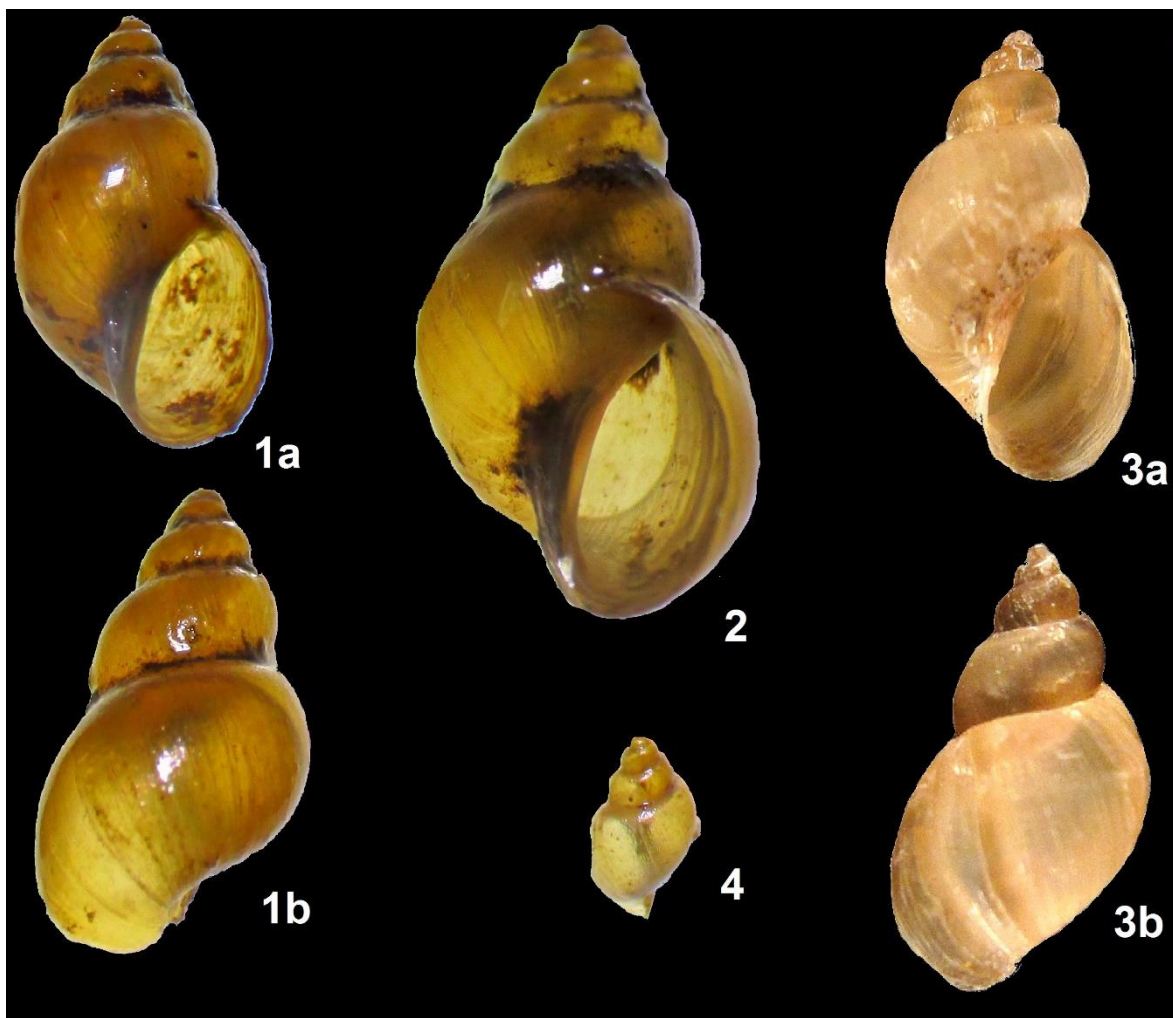


Figura 12. *Galba truncatula*. 1. El Helechal, Mutiscua (Norte de Santander) 9X4 mm (alto por ancho). 2. El Helechal, Mutiscua (Norte de Santander) 11x4 mm. 3. La Paradita, Mutiscua (Norte de Santander) 7.2 mm de altura. 4. El Helechal, Mutiscua (Norte de Santander) 2x1 mm.

La anatomía interna de *G. truncatula* muestra similitud con otras especies de *Galba*, siendo en muchos casos indistinguible de *G. schirazensis*. Sin embargo, algunas características como el tamaño y forma de la próstata, y la longitud de la vaina del pene y prepucio, pueden servir de orientación preliminar mientras se realiza confirmación molecular. Figura 13.

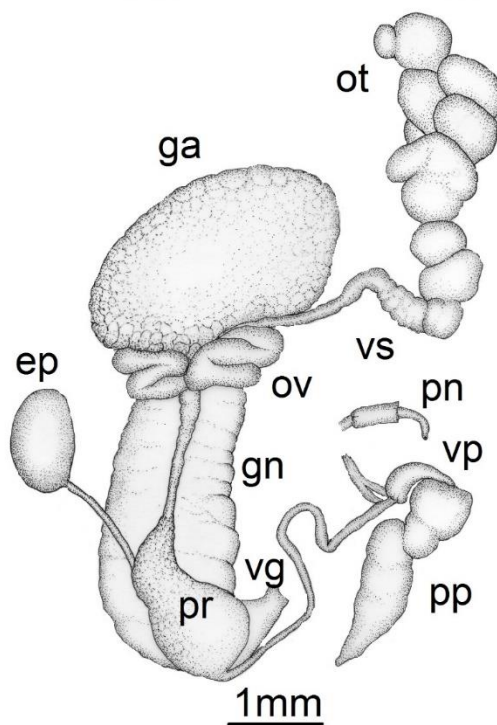


Figura 13. Anatomía de sistema reproductor de *Galba truncatula*. Espécimen de Mutiscua (Norte de Santander). ga: glándula albuminar; ep: espermateca; pr: próstata; ot: ovotestis; ov: oviducto; vg: vagina; vs: vesícula seminal; pn: pene; pp: prepucio; vp: vaina del pene; gn: glándula nidamental. Ilustraciones de Jean-Pierre Pointier.

8.2.4. *Galba schirazensis* (Küster, 1862). (*Lymnaea schirazensis* Küster, 1862). Su localidad tipo es Schiras, Irán. Esta especie fue caracterizada por métodos moleculares a partir del año 2010, revelado que se trata de una especie altamente invasiva y distribuida a nivel mundial (M. Dolores Barges et al., 2012; Correa et al., 2010; Manon Lounnas, Correa, et al., 2017). Dada su similitud morfológica con otras especies del neotrópico, en especial con *G. truncatula*, es posible que haya sido confundida y mal identificada en reportes anteriores a 2009, cuando fue informada

inicialmente como una especie críptica y denominada *Lymnaea* sp. (*Galba* sp.) (Correa et al., 2010).

El tamaño de los adultos es generalmente más pequeño que el de las especies más relacionadas (*G. truncatula*, *G. cubensis* o *G. viator*), sin embargo, esta característica no tiene valor taxonómico. Las dimensiones de los moluscos colectados de esta especie variaron entre 2-7 mm de alto y 1-4 mm de ancho. Figura 14. De otro lado, el pequeño tamaño de algunos individuos hace que sea difícil o incluso imposible su disección y, por lo tanto, el estudio de su anatomía interna (M. Dolores Bargues et al., 2012). En cuanto a su sistema reproductor, la vaina del pene es más corta que el prepucio; la próstata es pequeña, ovada y más o menos rectangular, pero estas características son variables y no permiten una identificación confiable, ya que su anatomía es similar a la de otras especies de *Galba*. Figuras 15 y 16. Los estudios morfológicos en *G. schirazensis* y otras cuatro especies de *Galba* del neotrópico demostró que las características de la concha y partes blandas no permite determinar la especie en individuos colectados en poblaciones naturales (Correa et al., 2011) Figura 17.

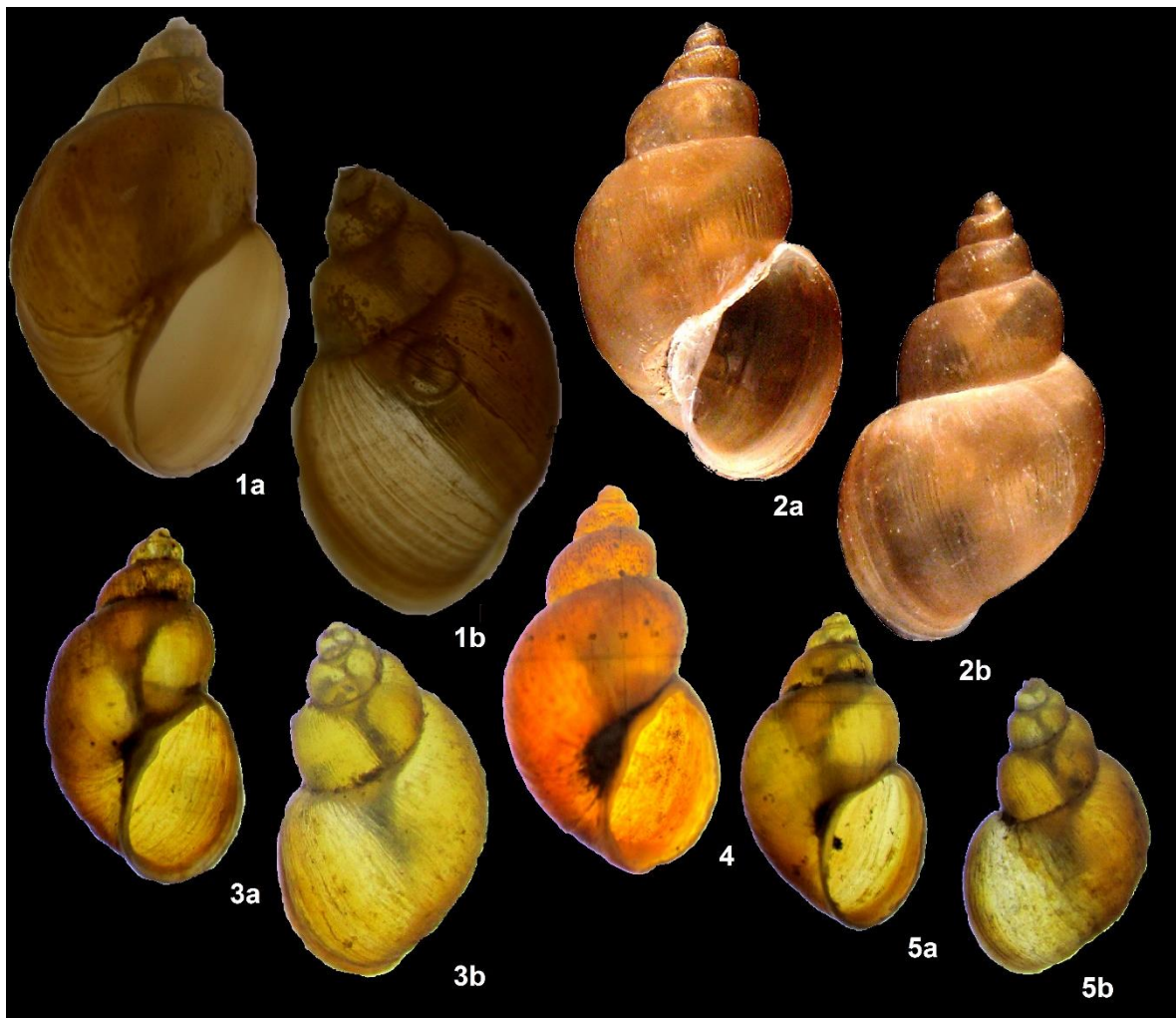


Figura 14. *Galba schirazensis*. 1. El Amarillo, Barbosa (Santander) 7x4 mm (alto por ancho); 2. El Hato, San Andrés (Santander) 6.3 mm de altura; 3. Villegas, Molagavita (Santander); 4x3 mm (No confirmado molecularmente); 4. El Cedro, Molagavita (Santander) 4x3 mm (No confirmado molecularmente); 5. Villegas, Molagavita (Santander) 3x2 mm (No confirmado molecularmente).

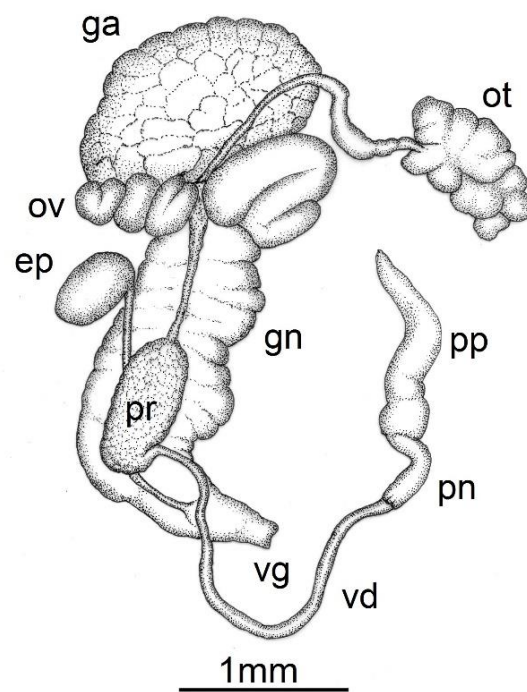


Figura 15. Anatomía de sistema reproductor de *Galba schirazensis*. Espécimen de San Andrés (Santander). ga: glándula albuminar; ep: espermateca; pr: próstata; ot: ovotestis; ov: oviducto; vg: vagina; vd: vaso deferente; pn: pene; pp: prepucio; gn: glándula nidamental. Ilustraciones de Jean-Pierre Pointier.

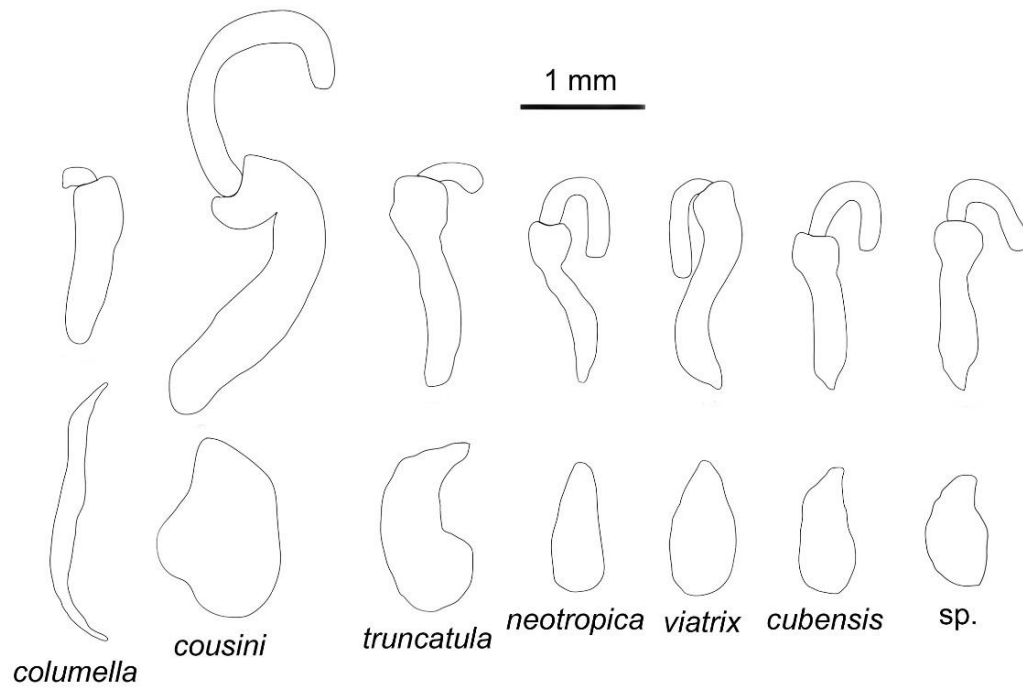


Figura 16. Anatomía del complejo peneal (arriba) y próstata (abajo) de limneidos del neotrópico. La especie denominada “sp.” corresponde a *G. schirazensis*. Fuente: Correa *et al.*, 2011 (Correa *et al.*, 2011).

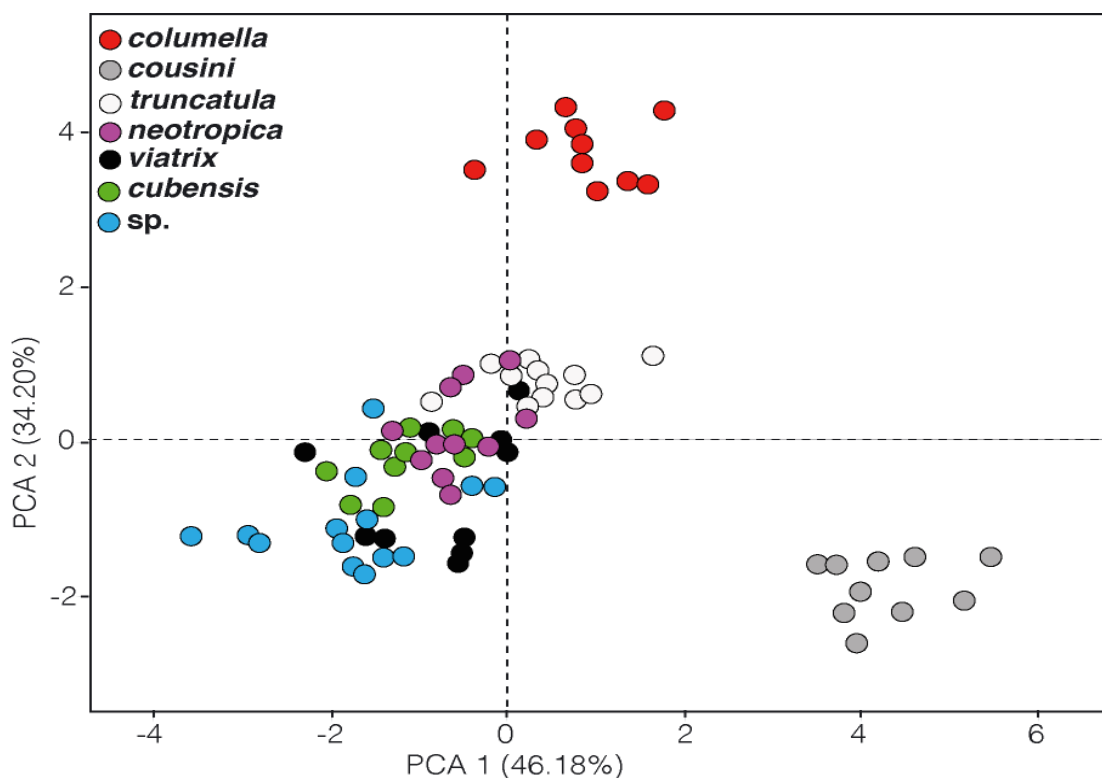


Figura 17. Morfología de limneidos del neotrópico. Análisis de componentes principales obtenido del alto y ancho de la próstata, longitud de pene y prepucio, ancho de la vaina del pene, alto y ancho de la concha, de siete especies de limneidos de Sudamérica. Cada punto representa un individuo (N=81). La especie denominada “sp.” corresponde a *G. schirazensis*. Fuente: Correa *et al.*, 2011 (Correa *et al.*, 2011).

8.3 Confirmación molecular de especies de limneidos

Una vez clasificados morfológicamente los moluscos colectados, se seleccionaron uno o dos individuos por punto de muestreo para identificación molecular usando el marcador COI (en inglés COX1). De los 48 puntos de muestreo positivos para limneidos, se confirmó la especie presente en 45, distribuidos en 16 municipios en cuatro departamentos, y se correlacionó con las características morfológicas y altitud del lugar de colecta.

8.3.1 Extracción de ADN. Se realizó extracción de ADN por *salting out* como se describió en la metodología, entre uno y sesenta días posteriores a la preservación de los moluscos en etanol 70%. El material genético obtenido fue almacenado a -20°C en la genoteca del Laboratorio Central de Investigación de la Facultad de Salud. En general, las muestras conservaron integridad, revelada por la electroforesis en gel de agarosa al 1%. La cuantificación en NanoDrop mostró rangos entre 100 ng/μL y 1000 ng/μL; la relación 260/280 varió de 1.77 a 2.09 (>1.8 es considerado puro), y la relación 260/230 de 0.50 a 1.92 (>2 es el valor esperado para ADN puro). Sobre este último aspecto, se puede mencionar que algunas muestras presentaron un pico de absorción entre 220 y 230 nm que disminuyó la relación 260/230; la naturaleza de este pico no fue esclarecida, sin embargo, puede estar relacionada con contaminantes durante el proceso de extracción o componentes de la muestra. Aquellas que presentaron este pico inusual fueron amplificadas exitosamente, decir, no interfirió con el proceso de PCR. Figura 18.

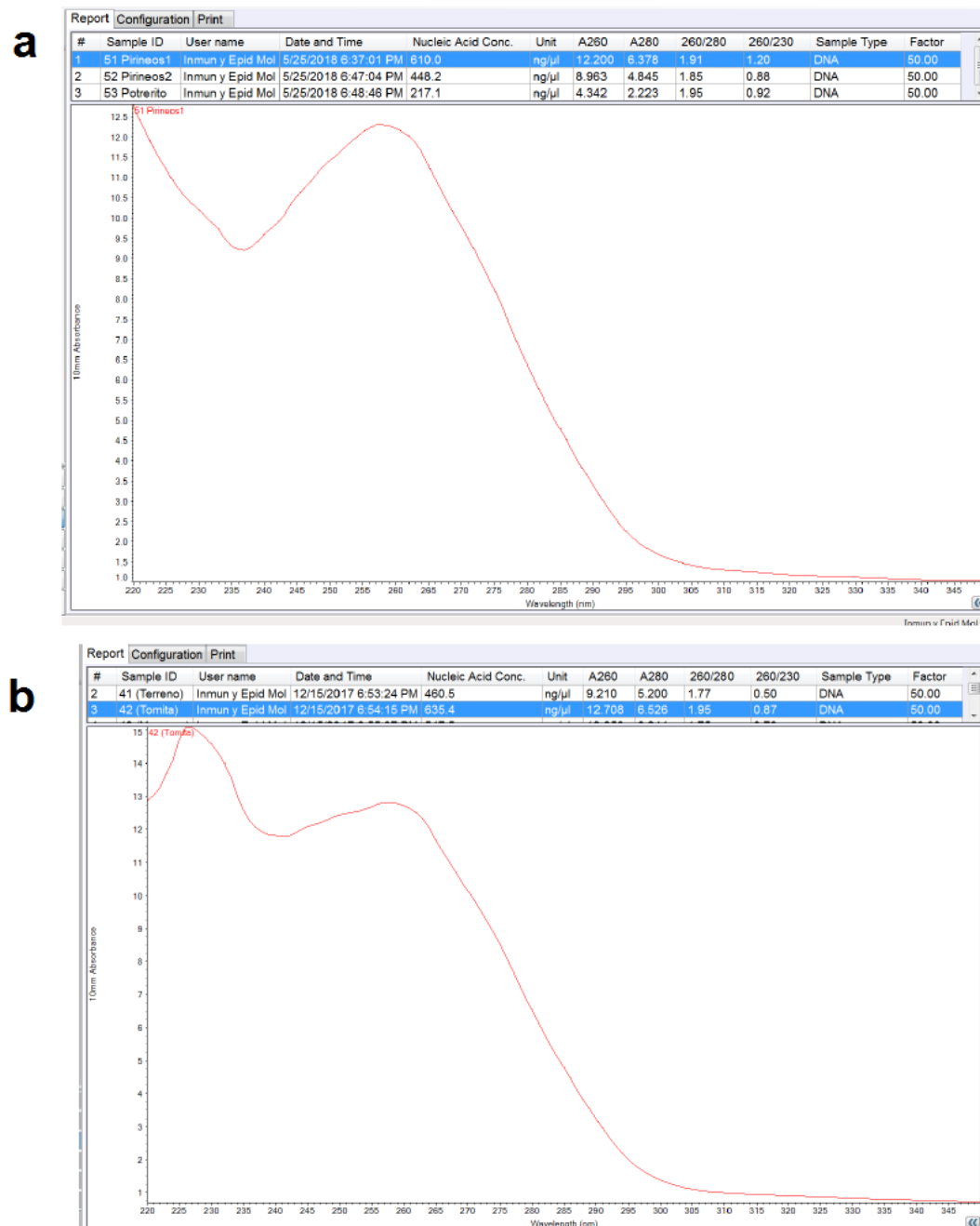


Figura 18. Gráfica de absorbancia por NanoDrop (Thermo Scientific, NanoDrop 1000) de dos muestras de ADN. a: Vetas (Santander). La gráfica es típica de ADN con pico de máxima absorción a 260 nm. b: Encino (Santander). La gráfica presenta un pico inusual entre 220 nm y 230 nm, relacionados en la literatura con contaminantes como carbohidratos, glucógeno, fenol y guanidina (T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, s/f).

8.3.2 Amplificación del marcador COI por PCR de punto final. La amplificación del marcador COI fue realizada a 48 muestras de ADN siguiendo el procedimiento descrito por Correa *et al.*, 2011 (Correa *et al.*, 2011). Los productos de PCR se revelaron en gel de agarosa 1.5% mostrando una única banda de aproximadamente 700 pb. En la Figura 19 se muestra a manera de ejemplo la amplificación de tres muestras de limneidos.

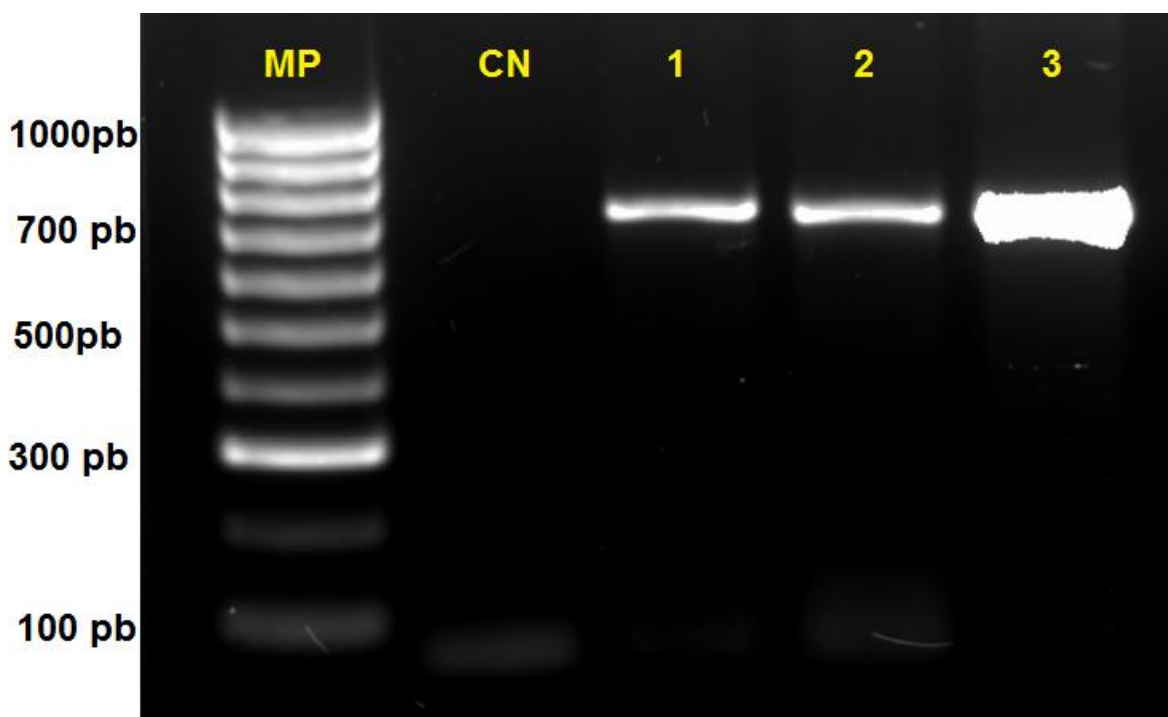


Figura 19. PCR para el marcador COI. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de productos de PCR para el marcador COI de tres muestras de limneidos. MP: Marcador de peso molecular (HyperLadder IV Bioline); CN: Control negativo; 1: muestra 64 Onzaga (Sector dos pisos) 431 ng/ μ L. 2: muestra 65 Onzaga (Escuela veredal Chaguacá) 988 ng/ μ L; 3: muestra 65d (diluída) Onzaga (Escuela veredal Chaguacá) 112 ng/ μ L.

8.3.3 Secuenciación de los amplificadores. Se secuenciaron 48 productos de PCR en la empresa MacroGen, Inc., incluyendo un servicio de purificación y BLAST. La Figura 20 muestra a manera de ejemplo un cromatograma resultado de la secuenciación y electroforesis capilar.

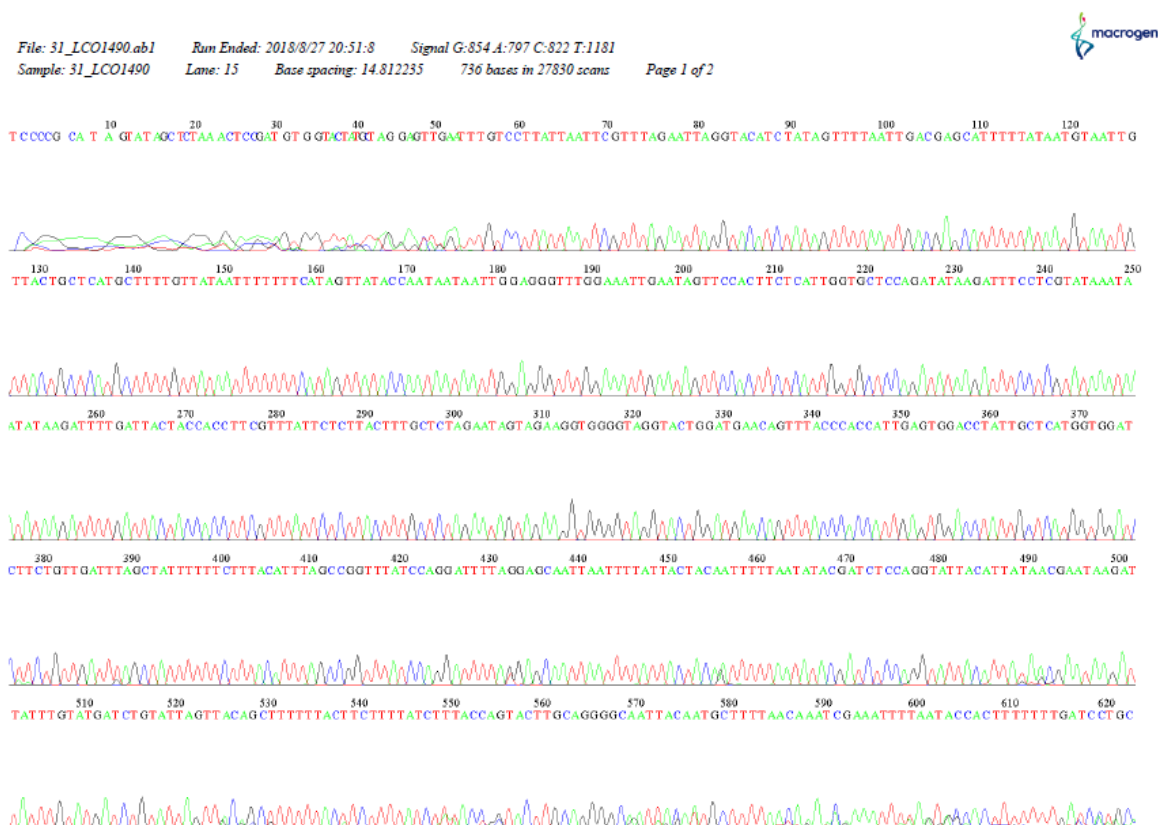


Figura 20. Cromatograma que muestra el resultado de la secuenciación del producto de PCR del COI de una muestra de Lebrija (Santander).

8.3.4 Alineamiento de Secuencias. Cada cromatograma fue revisado a nivel de nucleótido en el software BioEdit 7.2.5 para asegurar la calidad de la secuencia. Las regiones iniciales y finales fueron descartadas reduciendo los fragmentos a 600 pb para hacer el análisis de homología con las secuencias publicadas en el GenBank por medio de la herramienta BLAST. Se confirmó la

identidad de la especie de acuerdo al mayor apareamiento en el BLASTN con un umbral de similitud del 99-100%. En tres muestras no se obtuvieron resultados concluyentes debido a mala calidad de la secuencia. Anexo 2. Además, en un punto de muestreo se identificó una especie de caracol terrestre (*Succinea* sp.), que había sido confundida con un limneido por morfología de la concha.

Se identificaron las siguientes especies: *Pseudosuccinea columella*, *Galba cousini*, *Galba truncatula* y *Galba schirazensis*. Se compararon las secuencias obtenidas con los resultados de estudios de genética poblacional realizados en algunas especies.

Ocho secuencias correspondieron a *Pseudosuccinea columella*: seis coincidieron con la ingresada en el GenBank como KF412765.1 de origen egipcio, una con el aislamiento de Egipto “Pc.2” (LC015521.1), y una con el aislamiento de Colombia “Lc11” (JN614406.1). En un estudio publicado por Lounnas *et al.*, 2017, se evaluó la distribución de la diversidad genética de esta especie a la mayor escala geográfica analizada en la actualidad (M. Lounnas *et al.*, 2017). El árbol construido por el método de máxima verosimilitud de los haplotipos del ADN mitocondrial (incluyendo el marcador COI) resultó en 10 clados principales. El clado 2 es uno de los más externos y comprende a poblaciones de Colombia; mientras que el clado 10 tiene distribución mundial y agrupa a secuencias COI recuperadas del GenBank de Australia, Egipto y USA. En este trabajo se identificaron siete poblaciones que concuerdan con el clado 10 (KF412765.1, LC015521.1) ubicadas en Lebrija, Piedecuesta, Zapatoca y Páramo en el departamento de Santander, y Moniquirá en Boyacá. La población de Barbosa (Santander) se puede ubicar en el clado 2. De acuerdo al estudio citado, las poblaciones identificadas corresponden a un único haplotipo encontrado en regiones donde esta especie es invasora.

Las 21 secuencias correspondientes a *Galba cousini* coincidieron en su totalidad con el haplotipo “L.cous.cox1-b” de la Sabana de Bogotá, registrado como FN598162.1 en el GenBank por Bargues *et al.*, 2011 (M Dolores Bargues, Artigas, Khoubbane, & Mas-Coma, 2011). En un estudio realizado por Uribe *et al.*, 2014, se encontró un nuevo haplotipo denominado “*L. cousini* D” en una población de Santander y una de Norte de Santander, cuya distancia intraespecífica con el haplotipo “L.cous.cox1-b” es de 0,8 % (Uribe *et al.*, 2014).

Galba truncatula fue identificada a partir de cinco secuencias de la siguiente manera: cuatro correspondientes a “*Galba truncatula* haplotype b” de Venezuela (JF461487.1), y una al aislamiento “VEN_Mucu_04” (KT781318.1). Todas las anteriores han sido reportadas en Sudamérica (M. Dolores Bargues *et al.*, 2011).

Las secuencias correspondientes a *Galba schirazensis* coincidieron con dos aislamientos: tres para “Madeira” (HG977207.1), y dos para “PER_LaJo_01” (KY198260.1). El aislamiento “PER_LaJo_01” fue obtenido a partir de un estudio sobre genética poblacional de esta especie realizado por Lounnas *et al.*, 2018, y clasificado como haplotipo 2 (Manon Lounnas, Correa, *et al.*, 2017).

8.4 Infección natural por *Fasciola hepatica* en limneidos

Se examinaron 1639 caracoles encontrándose una prevalencia de infección natural del 4.2% (69/1639). Anexo 2. Se identificaron redias, cercarias y metacercarias de *F. hepatica* mediante

claves taxonómicas (Cordero del Campillo, 2001; Hussein, Hassan, & Khalifa, 2010; Schell SC, 1985). Figura 21.

La infección natural de limneidos se observó a partir de 2279 m.s.n.m. (El Guayabo, Encino Santander) hasta los 3867 m.s.n.m. (Laguna Potrerito, Vetas, Santander), en los municipios de Onzaga, Encino y Vetas (Santander), Belén (Boyacá), y Mutiscua (Norte de Santander). Las especies implicadas fueron *Galba cousini* (98.5%) en Onzaga, Encino, Belén, Vetas; y *Galba truncatula* (1.5%) en Mutiscua. Tabla 4

En los municipios de Onzaga, Encino y Belén se ha demostrado la presencia de fasciolosis bovina y ovina por coprología y serología en las mismas localidades donde fueron colectados los limneidos (datos de la Línea de Parasitología humana y veterinaria sin publicar). Tanto *G. cousini* como *G. truncatula* hacen parte de las siete especies confirmadas como hospederos intermediarios de *F. hepatica* en el neotrópico (Yannick Caron et al., 2017), por lo que este hallazgo permite relacionar las especies encontradas con focos activos de transmisión. En los puntos muestreados de Vetas y Mutiscua se hallaron moluscos infectados y se observó la presencia de ganado ovino o bovino; sin embargo, se desconoce si los animales de estas fincas estaban infectados con *F. hepatica*.

En algunos moluscos colectados en la localidad Balmoral del municipio de Sotaquirá en Boyacá, se hallaron numerosos oligoquetos (Annelida, Clitellata) asociados a la masa cefalopodal debajo del manto y en la concha. Estos limneidos fueron colectados de sedimentos suaves de lodo

y barro alrededor de cuerpos de agua dulce. Figura 22. Algunos representantes de este grupo de lombrices son reconocidos como simbios de caracoles y almejas.

Tabla 4.

Infección natural por F. hepatica en limneidos de Santander, Boyacá y Norte de Santander.

Municipio (Departamento)	Localidad	limneidos examinados	limneidos infectados	(%)	Estadios hallados	Especie de limneido
Onzaga (Santander)	Esmeralda Garrocha	180	2	1	Redias	<i>G. cousini</i>
Encino (Santander)	Vergel Manzano Guayabo	70	12	17	Redias y cercarias	<i>G. cousini</i>
Vetas (Santander)	Vega Pirineos Potrerito	140	14	10	Redias y metacercarias	<i>G. cousini</i>
Belén (Boyacá)	Alisal Tomita Terreno	199	40	20	Redias	<i>G. cousini</i>
Mutiscua (Norte de Santander)	Helechal	68	1	1.5	Redias y cercarias	<i>G. truncatula</i>

La determinación de infección natural en limneidos basada únicamente en la morfología de los estadios larvarios ya se ha realizado en otros estudios (Ángel Villavicencio & Vasconcellos, 2005; Rondelaud et al., 2004). Villavicencio *et al.* en 2005, reportaron la prevalencia de infección natural por *F. hepatica* más alta registrada para *G. cousini* (31.43%-22/70), encontrando redias y cercarias al examen directo en estereoscopio (Ángel Villavicencio & Vasconcellos, 2005). La infección natural de *G. truncatula* ha sido reportada en países europeos y asiáticos con prevalencias hasta del 42.8% (OHARI, HAYASHI, MOHANTA, KUWAHARA, & ITAGAKI, 2017; Rondelaud et al., 2004). Un estudio en Francia reveló infección natural de *G. truncatula* por *F. hepatica* y *Paramphistomum daubneyi*, diferenciados por morfología (Rondelaud et al., 2004). En *P. columella* se han reportado tasas de infección natural en Cuba y Argentina que van del 1% al

17.5% (Cucher, Carnevale, Prepelitchi, Labbé, & Wisnivesky-Colli, 2006; Gutiérrez et al., 2011; M. Lounnas et al., 2017).

De otro lado, las técnicas moleculares, cuando están disponibles, pueden aumentar significativamente la sensibilidad y especificidad. En Ecuador se encontraron prevalencias de infección natural de *G. schirazensis* por *F. hepatica* de 1.75% por microscopía y 6% por PCR (Yannick Caron et al., 2017); sin embargo, los autores advierten que la PCR puede sobreestimar la prevalencia real ya que detecta ADN específico pero no brinda información sobre la viabilidad de los parásitos (Yannick Caron et al., 2017). En Argentina se reportaron tasas de infección de *P. columella* por *F. hepatica* de 17.5% por microscopía y 51.3% por PCR (Cucher et al., 2006). Solo estos dos estudios han abordado la infección natural de limneidos por técnicas moleculares en Sudamérica (Yannick Caron et al., 2017; Cucher et al., 2006). Aunque la identificación morfológica tiene una buena especificidad, métodos como la PCR multiplex diseñada por Caron et al., pueden ayudar a aumentar la sensibilidad (Y. Caron, Righi, Lempereur, Saegerman, & Losson, 2011).

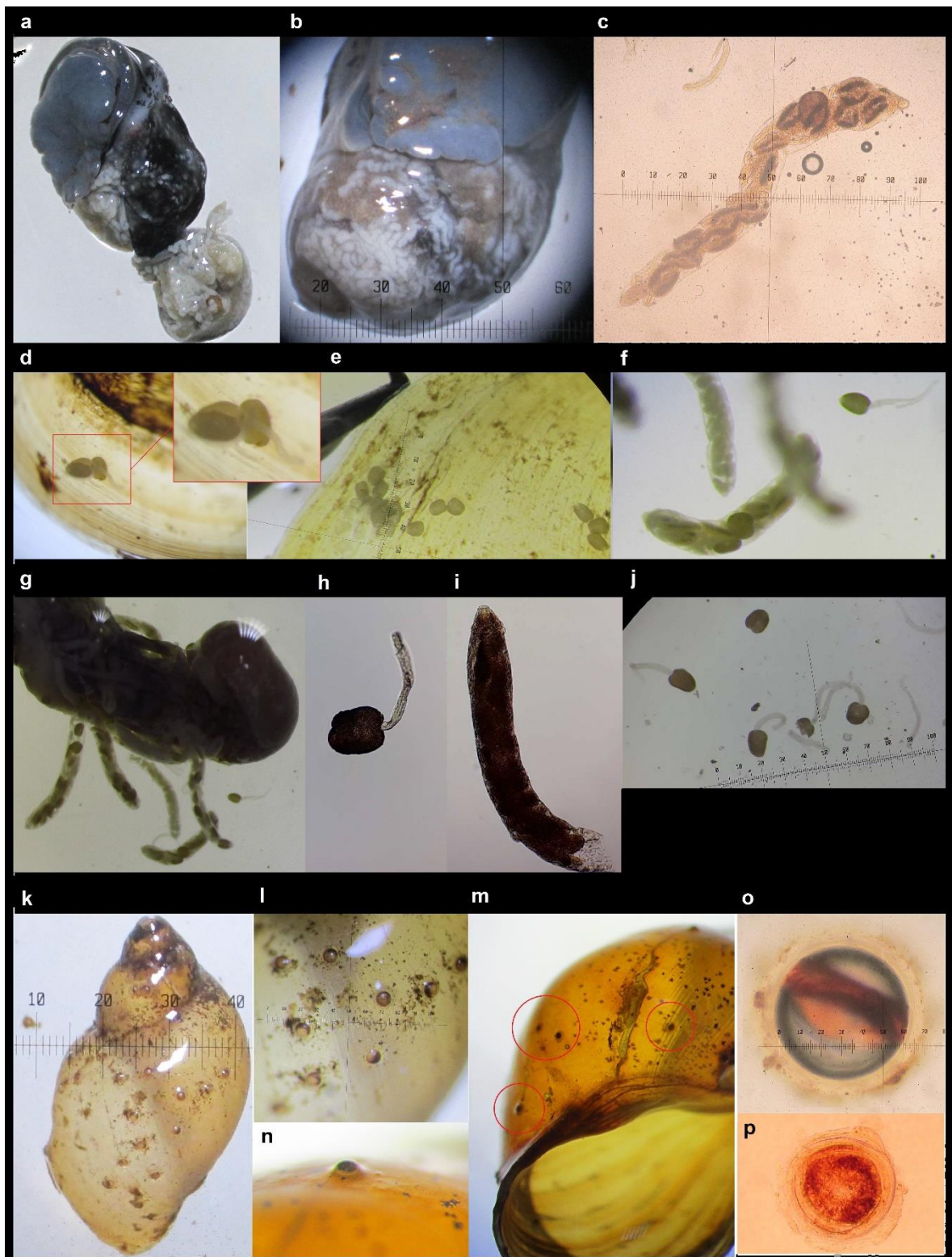


Figura 21. Estadios larvarios de *F. hepatica* en *Galba cousini* y *Galba truncatula*. a, b. redias en *G. cousini* 10x estereoscopio (est.); c. redia en *G. cousini* 10x microscopio óptico (m.o); d, e. cercarias en concha de *G. truncatula* 10x Est.; f. redias y cercaria en *G. truncatula* 10x Est.; g.

redias y cercarias en *G. truncatula* 10x Est.; h. cercaria 10x M.O; i. redia 10x M.O; j. cercarias 40x Est.; k, l, , m, n. metacercarias en la superficie de la concha; o, p. metacercarias 100x M.O.

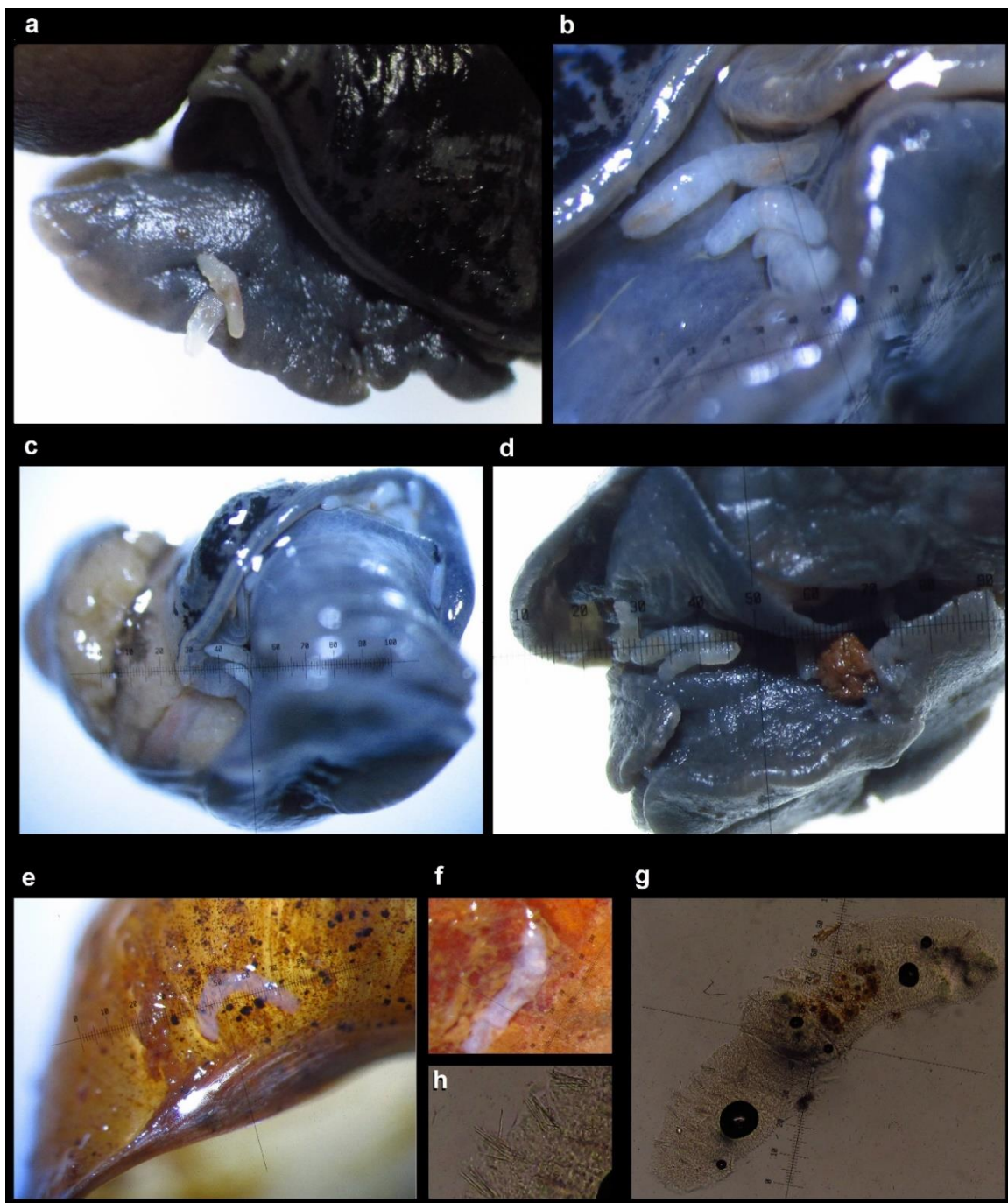


Figura 22. Oligoquetos en *G. cousini*. a, b. sobre el pie y la región cefálica; c, d. por debajo del manto; e, f. sobre la concha; g. aclaramiento en lactofenol, 10 X; h. acercamiento de las quetas, 40x.

8.5 Distribución de especies de limneidos en Santander, Boyacá y municipios limítrofes.

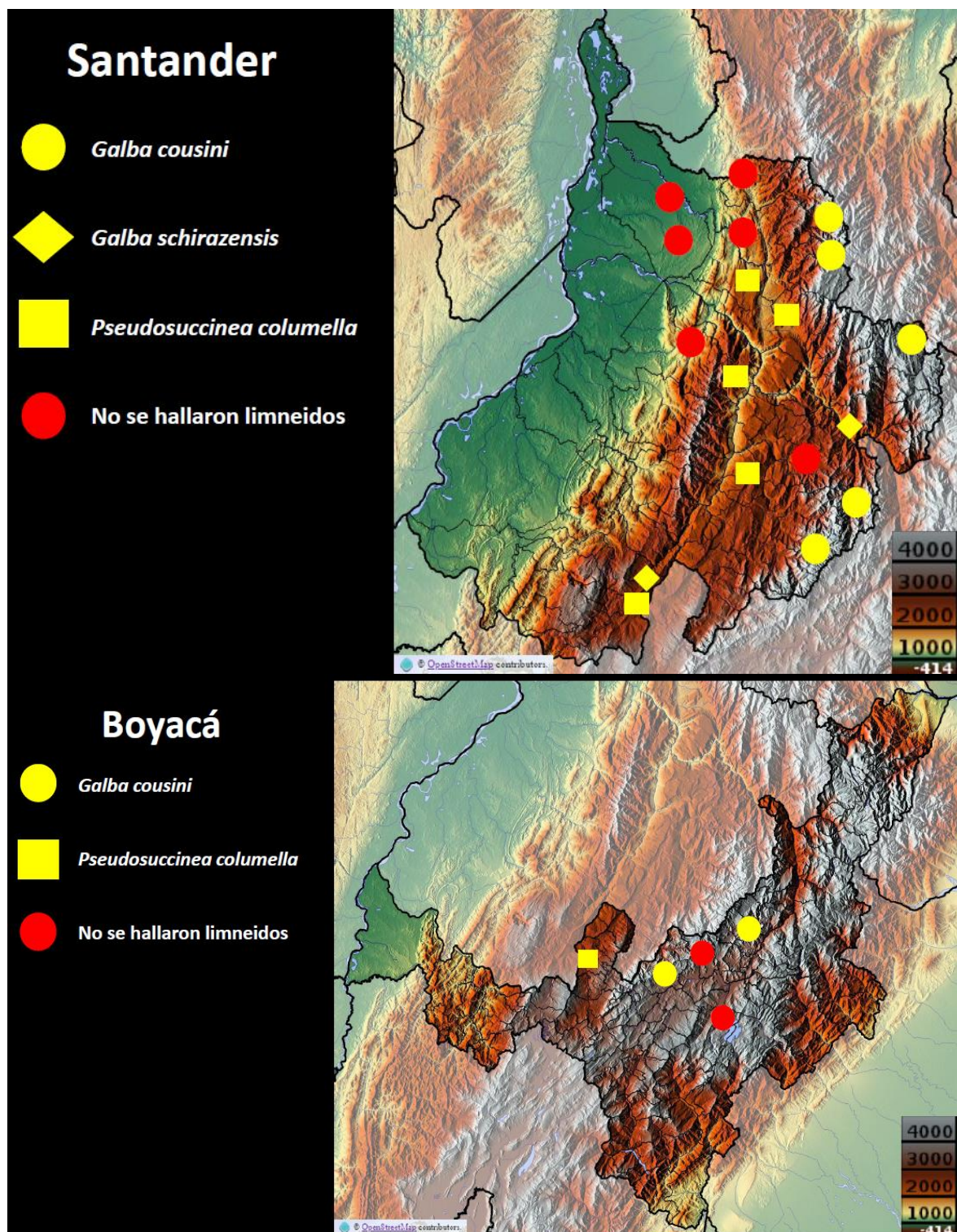


Figura 23. Distribución de especies de limneidos en Santander, Boyacá.

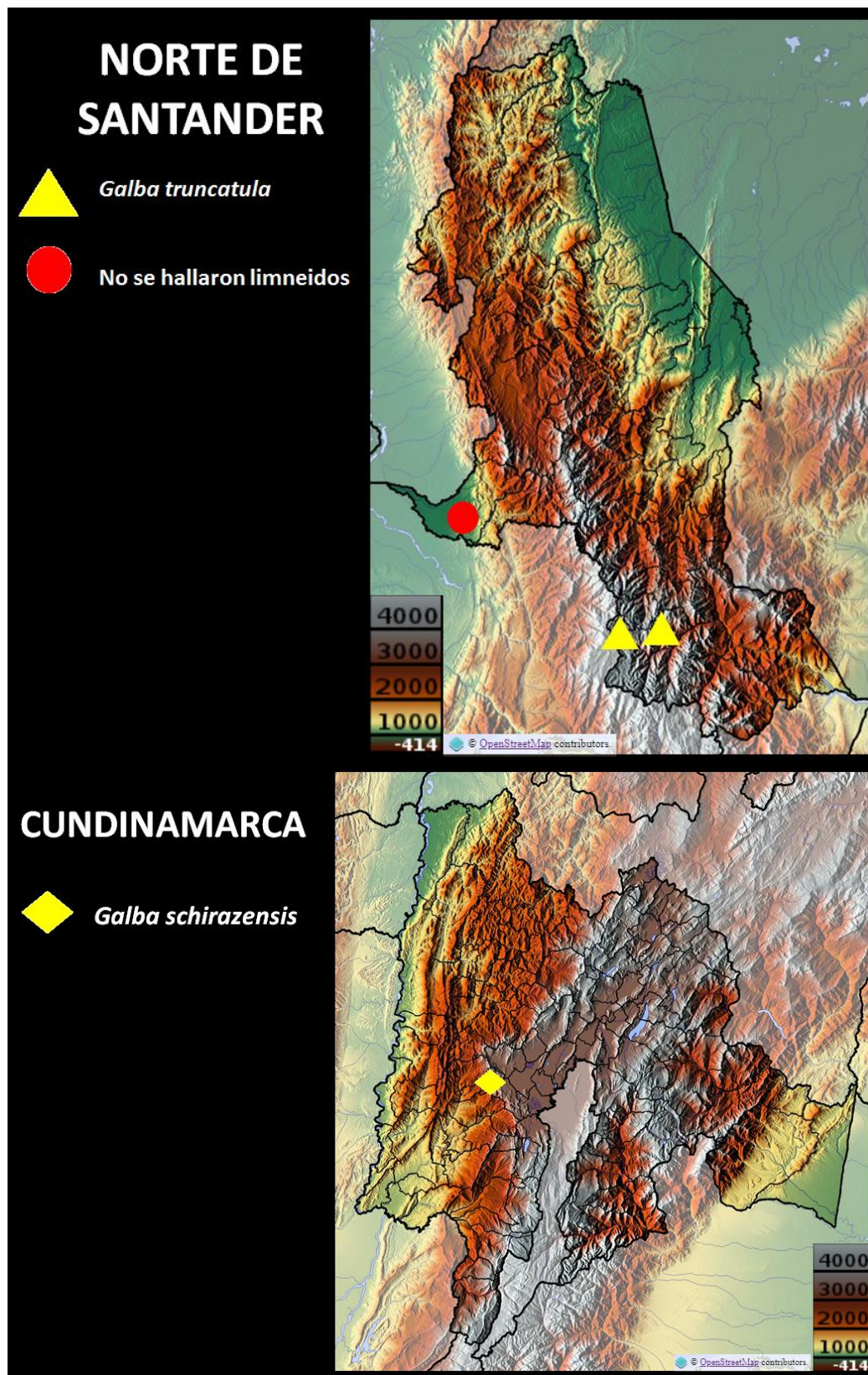


Figura 24. Distribución de especies de limneidos en Norte de Santander, Cundinamarca.

En Santander se encontraron las especies *G. cousini*, *G. schirazensis* y *P. columella* en 11 de 16 municipios (68.75%). En Boyacá se hallaron las especies *G. cousini* y *P. columella*. En Norte de Santander sólo se encontró la especie *G. truncatula*; y en Zipacón (Cundinamarca) se halló la especie *G. schirazensis*. Tabla 5.

Tabla 5.

Distribución de especies de limneidos en Santander, Boyacá, y municipios limítrofes.

Municipio	Puntos muestreados	Rango de altitud muestreado (m.s.n.m.)	Especies identificadas
Santander			
El Playón	3	525 – 856	-
Rionegro	3	583 – 590	-
Sabana de Torres	9	126 – 145	-
Lebrija	3	1012 – 1081	<i>P. columella</i>
Piedecuesta	2	1016 – 1130	<i>P. columella</i>
San Vicene de Chuchurí	4	651 – 845	-
Zapatoca	1	1720	<i>P. columella</i>
Vetas	8	3775 – 3870	<i>G. cousini</i>
Tona	2	3377 – 3394	<i>G. cousini</i>
Páramo	1	1217	<i>P. columella</i>
Mogotes	8	1819 – 2283	-
Onzaga	13	2067 – 3226	<i>G. cousini</i>
Encino	18	1520 – 2834 ^a	<i>G. cousini</i>
Cerrito	1	3178	<i>G. cousini</i>
Molagavita	2	2099 – 2943	<i>G. schirazensis</i> ^b
Barbosa	4	1538 – 1700	<i>P. columella</i> , <i>G. schirazensis</i>
Boyacá			
Moniquirá	4	1538 – 1600	<i>P. columella</i>
Sotaquirá	9	2556 – 3035	<i>G. cousini</i>
Belén	10	2850 – 3177	<i>G. cousini</i>
Duitama	3	2700 – 2833	-
Tota	1	3032	-

Norte de Santander			
La Esperanza	1	336	-
Mutiscua	4	2857 – 3295	<i>G. truncatula</i>
Pamplona	1	2182	<i>G. truncatula</i>
Cundinamarca			
Zipacón	1	1630	<i>G. schirazensis</i>

a. positivo a partir de 2391 m.s.n.m. **b.** solo se hizo identificación morfológica.

La distribución de *G. cousini* en Santander y Boyacá predominó sobre las otras especies en las zonas de bosque altoandino y páramo, encontrándose desde los 2067 m.s.n.m. en campos de berros, bebederos, zanjas de drenaje y pequeñas fuentes de agua de fincas ganaderas, hasta lagunas a más de 3870 m.s.n.m. en el Páramo de Santurbán, siendo la especie hallada en el rango de altitud más amplio. También ha sido reportada en el páramo de Túquerres, (Nariño, Colombia) a 3200 m.s.n.m. En Venezuela se encontró en el estado de Mérida hasta los 4193 m.s.n.m. en una laguna de páramo (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014), indicando que esta especie está adaptada a vivir en pequeñas fuentes de agua y lagunas a una gran altitud. Figura 23.

G. truncatula se halló en Norte de Santander en una finca ganadera, drenajes de carretera y tanques. Su rango de altitud fue de 2182 m.s.n.m. hasta 3295 m.s.n.m. Figura 24. El único reporte de esta especie en Colombia basado en la identificación molecular por el marcador COI fue hecho por Velásquez *et al.* en 2011 (Velásquez, 2011). *G. truncatula* es una de las especies más distribuidas en el continente, reportada en la cordillera de los Andes en Venezuela, Bolivia, Perú, Chile y Argentina desde la década el 2000 (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Esta especie parece estar adaptada a hábitats con gran altitud; en los Andes de Venezuela se ha

encontrado desde 1909 m.s.n.m. hasta 3988 m.s.n.m. (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

En Colombia se describió inicialmente la especie críptica *Galba* sp., pero recientes estudios confirman su identidad como *G. schirazensis*. (Correa et al., 2010, 2011; Manon Lounnas, Correa, et al., 2017). Esta especie fue identificada en áreas de Santander y Cundinamarca entre 1566 - 2943 m.s.n.m. siendo la segunda con mayor distribución altitudinal por detrás de *G. cousini*. En el estado andino de Mérida en Venezuela fue encontrada en un rango similar que en Santander, entre 1170 – 2667 m.s.n.m. (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). Su hábitat comprendió quebradas, riachuelos y acequias. Figura 25.

P. columella es considerada como una de las especies de moluscos dulceacuícolas más distribuidas en el mundo (M. Lounnas et al., 2017). Ha sido reportada en Sudamérica y el Caribe colonizando numerosos tipos de agua estacionaria (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). En Santander y Boyacá fue hallada entre 1012 m.s.n.m. hasta 1720 m.s.n.m. Es la especie predominante por debajo de los 2000 m.s.n.m. Su hábitat abarcó quebradas, riachuelos, represas y estanques. Figura 26.

Otra especie informada en Colombia es *G. cubensis* (Pfeiffer, 1839), en Barbosa, Antioquia (Correa et al., 2010). La localidad tipo es Cuba, donde es la principal implicada en la transmisión de fasciolosis por encima de *P. columella* (Vázquez et al., 2014). Su distribución es amplia en el continente, desde Estados Unidos y las Antillas, hasta Venezuela y Uruguay (Correa et al., 2011). A pesar de que en Venezuela está ampliamente distribuida por el norte del país, en especial en el

estado de Mérida, que comparte una región biogeográfica con Norte de Santander y Santander, no fue encontrada en los muestreos realizados en estos departamentos.

G. neotropica (Bargues *et al.*, 2007) también ha sido informada en Venezuela, país limítrofe con Norte de Santander. Esta especie, junto con *G. cubensis*, son muy cercanas molecularmente a *G. viator* (Correa *et al.*, 2011). Algunos autores sugieren que las tres especies se pueden considerar conespecíficas; de ser así, *G. cubensis* y *G. neotropica* serían sinónimos de *G. viator* (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014).

En Santander y Boyacá se hallaron tres de las cinco especies de limneidos reportadas en Colombia, dando cuenta de su gran diversidad favorecida por las características biogeográficas que abarcan diferentes pisos térmicos y ecosistemas.



Figura 25. Hábitat de *Galba cousini*. A. Finca ganadera, El Terreno (2910 m.s.n.m.) Belén, Boyacá. B. Finca ganadera, El Millón (2876 m.s.n.m.) Sotaquirá, Boyacá. C. Laguna, Potrerito (3867 m.s.n.m.) Vetás, Santander.



Figura 26. Hábitat de *Galba truncatula*. A. Drenaje de carretera, La Paradita (2902 m.s.n.m.) Mutiscua, Norte de Santander. B. Caño, Norte Gan (2182 m.s.n.m.) Pamplona, Norte de Santander. C. Finca ganadera, El Helechal (2900 m.s.n.m.) Mutiscua, Norte de Santander. D. Caño, La Paradita baja (2857 m.s.n.m.) Mutiscua, Norte de Santander. E. Poceta, El Alisal (2994 m.s.n.m.) Belén, Boyacá. En esta localidad de halló *Galba cousini* infectada en fuentes de agua de uso humano.

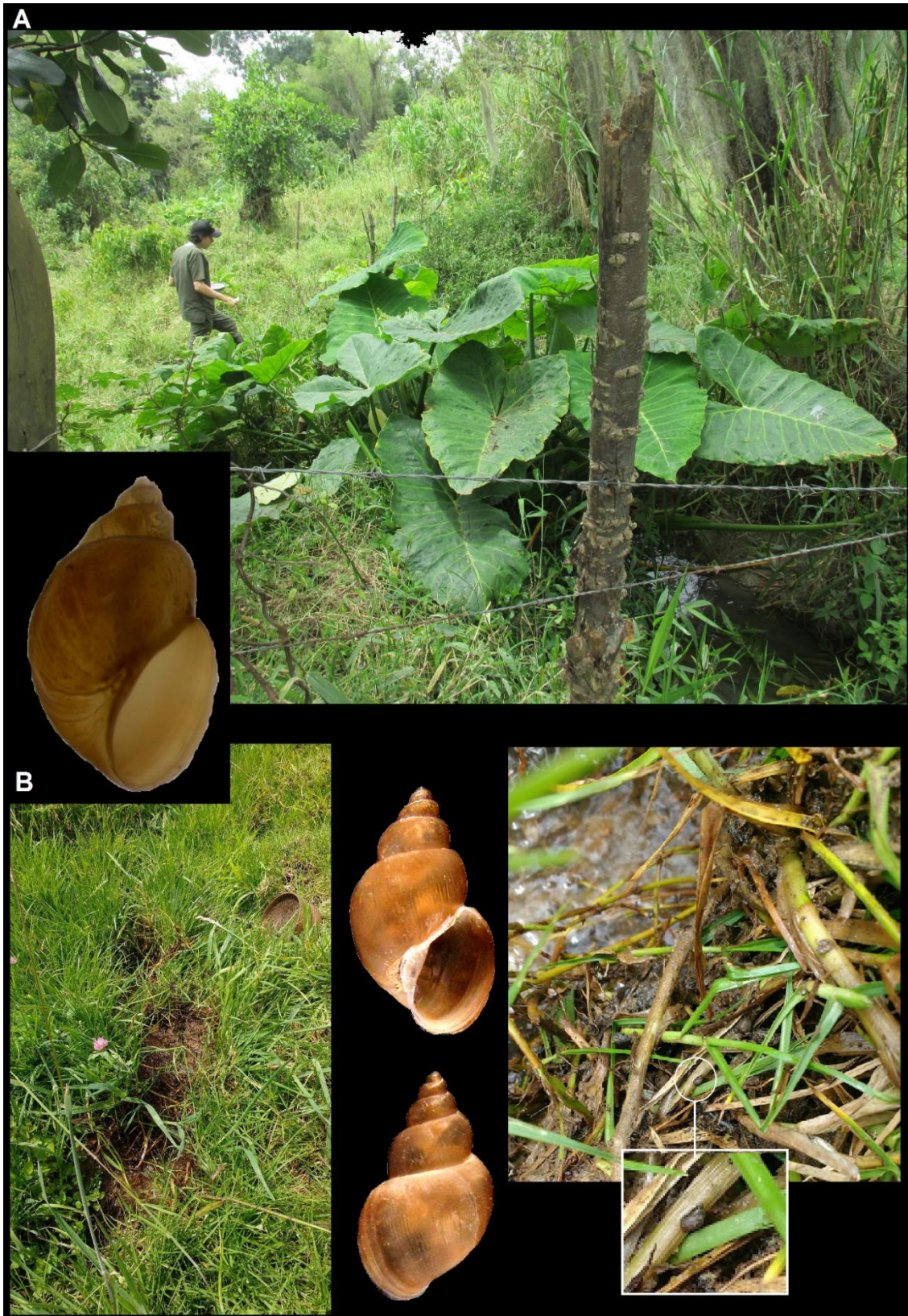


Figura 27. Hábitat de *Galba schirazensis*. A. Quebrada, Paraíso (1566 m.s.n.m.) Barbosa, Santander. B. Acequia, El Cedro (2943 m.s.n.m.) Molagavita, Santander.



Figura 28. Hábitat de *Pseudosuccinea columella*. A. Alberca, Sindamanoy (1720 m.s.n.m.) Zapatoca, Santander. B. Canal, La Angula (1033 m.s.n.m.) Lebrija, Santander. C. Represa, La Angula (1012 m.s.n.m.) Lebrija, Santander. D. Estanque, Juan Curí (1217 m.s.n.m.) Páramo, Santander. E. Quebrada, El Tablón (1700 m.s.n.m.) Barbosa, Santander.

8.6 Especies de limneidos en Santander y Boyacá y sus implicaciones en la transmisión de fasciolosis

Galba cousini ha sido asociada a focos activos de fasciolosis en Santander (Uribe et al., 2017). En Boyacá fue identificada en fincas ganaderas limítrofes con los municipios de Encino y Onzaga de Santander, donde se relaciona igualmente con el hallazgo de bovinos y ovinos positivos para *F. hepatica* por coprología y serología (datos de la Línea de Parasitología humana y veterinaria sin publicar) hallándose moluscos infectados naturalmente con redias y cercarias. *G. cousini* es posiblemente el principal hospedero intermediario de *F. hepatica* en Santander, Boyacá, y otras regiones de Colombia donde la fasciolosis es endémica. Su diversidad genética y poblacional ha sido poco estudiada, pero su distribución indica que está adaptada a vivir en grandes altitudes y variadas fuentes agua.

El hallazgo de *G. truncatula* naturalmente infectada en regiones de Norte de Santander dedicadas a la producción minifundista de leche, carne y lana, implica un posible rol en la transmisión, pues es un hospedero intermediario bien reconocido y el principal en algunas regiones de Europa (Alda et al., 2018; Brian Kendall, 1950; Houin, 2004).

El papel de *G. schirazensis* en la transmisión de fasciolosis es discutido (Yannick Caron et al., 2017; Manon Lounnas, Correa, et al., 2017). En cepas colombianas se demostró experimentalmente mayor compatibilidad con *Fascioloides magna* que con *F. hepatica*. Aparte de la observación en campo de Ecuador (Yannick Caron et al., 2017), no hay informes de infección

natural en esta especie. Las zonas de Cundinamarca y Santander donde fue identificada no están asociadas directamente a focos activos de fasciolosis.

La susceptibilidad de *Pseudosuccinea columella* a miracidios de *F. hepatica* y su participación en la transmisión de fasciolosis ha sido demostrada en Brasil y Cuba (Jean-Pierre Pointier & Alarcón de Noya, 2014). En Colombia, su rol como hospedero intermediario permanece desconocido, pues su descubrimiento en Santander y Boyacá no se asoció a focos de transmisión activos o zonas con reportes recientes de la enfermedad. Para establecer el rol de una cepa en la transmisión de fasciolosis, es necesario demostrar su compatibilidad en aislamientos colectados de focos activos, pues la observación en Cuba de cepas resistentes demuestra que dicho fenómeno es posible en esta especie (Calienes et al., 2004; Cañete, Yong, Sánchez, Wong, & Gutiérrez, 2004). Los mapas de distribución facilitan la localización de limneidos para posteriores estudios poblacionales y de relación hospedero-parásito.

En algunas fincas de Santander y Cesar por debajo de 2000 m.s.n.m. se han descubierto bovinos positivos para *F. hepatica* por coprología, sin hallazgo de moluscos limneidos en las fuentes de agua cercanas. Estas observaciones demuestran la necesidad de profundizar en la búsqueda de los posibles hospederos intermediarios presentes en esas zonas.

Por otro lado, en veredas de Santander y Boyacá donde habitan pequeños productores se concentran varios factores de riesgo para fasciolosis humana, empezando por la alta prevalencia del parásito en bovinos y ovinos (datos sin publicar), y la presencia de especies de limneidos asociadas a los focos de transmisión. Otros factores de riesgo son el consumo de agua y plantas

acuáticas crudas contaminadas con metacercarias y otros alimentos regados con agua no tratada o lavados de manera inadecuada antes de su preparación (datos sin publicar). La falta de educación en el tema y en medidas de salud pública también son factores predisponentes para una eventual infección humana con *F. hepatica*; como se observa en la Figura 24E, donde limneidos de la especie transmisora *G. cousini* fueron hallados en pocetas cuya agua es usada para el aseo personal (lavado de dientes) y otras actividades domésticas.

9 Conclusiones

El muestreo de moluscos Lymnaeidae en Santander y Boyacá fue representativo de las distintas zonas geográficas de estos departamentos. Sin embargo, la diversidad de limneidos en la región del Magdalena medio puede estar subestimada, pues no se incluyeron puntos en Boyacá, y en Santander fueron relativamente pocos respecto a su extensión. En este sentido, son necesarias más búsquedas en municipios como Barrancabermeja, Cimitarra y Puerto Boyacá para mejorar la resolución del muestreo en este biotopo.

Las especies de limneidos identificadas por características morfológicas fueron confirmadas por el marcador molecular COI en todos los casos, a excepción de *G. schirazensis* colectada en Molagavita (Santander), que solo se identificó a nivel morfológico. Debido a la similitud en la anatomía interna y morfología de concha que presenta esta especie con otras especies de *Galba*, es preciso hacer una nueva colecta de especímenes en este municipio para confirmación molecular de la especie. En este punto, es conveniente mencionar que recientemente fue estandarizada una

PCR múltiplex para diferenciar tres especies crípticas: *G. cubensis*, *G. schirazensis*, y *G. truncatula*, que puede ser útil en futuros estudios de limneidos en Colombia (Alda et al., 2018).

Los estadios larvarios de *F. hepatica* en los limneidos examinados fueron determinados por claves taxonómicas. Los especímenes fueron preservados en etanol 70%, pues en estudios posteriores es conveniente confirmar este hallazgo con pruebas moleculares cuando estén disponibles en la Línea de investigación, ya que los limneidos pueden ser hospederos intermediarios de otras especies de trematodos. En investigaciones epidemiológicas de fasciolosis que involucren la identificación de los hospederos intermediarios y su tasa de infección natural se recomienda emplear PCR específica para *F. hepatica* y así aumentar la sensibilidad respecto al examen directo. Existe una PCR múltiplex para limneidos y *F. hepatica* en la misma muestra de ADN, pero sólo identifica la especie *G. truncatula* (Y. Caron et al., 2011).

Se cumplió el objetivo propuesto, pues se identificó la distribución de cuatro especies de limneidos (*G. cousini*, *G. truncatula*, *G. schirazensis* y *P. columella*) en distintas regiones biogeográficas de Santander, Boyacá, y municipios limítrofes de Norte de Santander y Cundinamarca; además, se determinó el porcentaje de infección natural por trematodos en todos los moluscos colectados. Esta información contribuye al conocimiento de la diversidad de Lymnaeidae en el nororiente de Colombia. Además, se convierte en una herramienta a tener en cuenta para el diseño de medidas de prevención y control de enfermedades en las que intervienen limneidos. En este sentido, las visitas a productores y el contacto con las comunidades rurales en los municipios muestreados permitió informar sobre la importancia de la fasciolosis y recomendar medidas de salud pública para prevenir enfermedades causadas por trematodos transmitidos por los alimentos.

Referencias bibliográficas

- Aksenova, O. V., Bolotov, I. N., Gofarov, M. Y., Kondakov, A. V., Vinarski, M. V., Bespalaya, Y. V., ... Vikhrev, I. V. (2018). Species Richness, Molecular Taxonomy and Biogeography of the Radicine Pond Snails (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Old World. *Scientific Reports*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29451-1>
- Alda, P., Lounnas, M., Vázquez, A. A., Ayaqui, R., Calvopiña, M., Celi-Erazo, M., ... Hurtrez-Boussès, S. (2018). A new multiplex PCR assay to distinguish among three cryptic *Galba* species, intermediate hosts of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 251(670), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.006>
- Ángel Villavicencio, A., & Vasconcellos, M. C. de. (2005). First report of *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 735–737. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700010>
- Artigas, P., Bargues, M. D., Mera y Sierra, R. L., Agramunt, V. H., & Mas-Coma, S. (2011). Characterisation of fascioliasis lymnaeid intermediate hosts from Chile by DNA sequencing, with emphasis on *Lymnaea viator* and *Galba truncatula*. *Acta Tropica*, 120(3), 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.09.002>
- Ashworth, A. C., & Preece, R. C. (2003). The first freshwater molluscs from Antarctica. *Journal of Molluscan Studies*, 69(1), 89–92. <https://doi.org/10.1093/mollus/69.1.89>
- Bargues, M. D., Artigas, P., Mera y Sierra, R. L., Pointier, J. P., & Mas-Coma, S. (2007). Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(7), 621–641.

<https://doi.org/10.1179/136485907X229077>

Bargues, M. D., Mera y Sierra, R. L., Gómez, H. G., Artigas, P., & Mas-Coma, S. (2006).

Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. *Animal Biodiversity and Conservation*, 29(2), 191–194.

Bargues, M. Dolores, Artigas, P., Khoubbane, M., Ortiz, P., Naquira, C., & Mas-Coma, S.

(2012). Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-174>

Bargues, M. Dolores, González, L. C., Artigas, P., & Mas-Coma, S. (2011). A new baseline for

fascioliasis in Venezuela: Lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasites and Vectors*, 4(1).

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-200>

Bargues, M. Dolores, & Mas-Coma, S. (1997). Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based

on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14(5), 569–577.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025794>

Bargues, M.D., Bargues, M. D., Mas-Coma, S., Bargues, M. D., & Mas-Coma, S. (2005).

Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology*, 79(3), 257–267. <https://doi.org/10.1079/JOH2005297>

Bargues, M.D, Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R. ., Pointier, J. ., ... Mas-Coma, S.

(2001). European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 1(2),

85–107. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(01)00019-3)

- Bargues, M Dolores, Artigas, P., Khoubbane, M., & Mas-Coma, S. (2011). DNA sequence characterisation and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *L. meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasites & Vectors*, 4(1), 132. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-132>
- Bargues, Maria D., Mangold, A. J., Munoz-Antoli, C., Pointier, J.-P., & Mas-Coma, S. (1997). SSU rDNA Characterization of Lymnaeid Snails Transmitting Human Fascioliasis in South and Central America. *The Journal of Parasitology*, 83(6), 1086. <https://doi.org/10.2307/3284367>
- Bargues, Maria D., Mangold, A. J., Muñoz-Antoli, C., Pointier, J.-P. P., Mas-Coma, S., Munoz-Antoli, C., ... Mas-Coma, S. (1997). SSU rDNA Characterization of Lymnaeid Snails Transmitting Human Fascioliasis in South and Central America. *The Journal of Parasitology*, 83(6), 1086. <https://doi.org/10.2307/3284367>
- Bargues, María Dolores, Mera Y Sierra, R. L., Gómez, H. G., Artigas, P., & Mas-Coma, S. (2007). Caracterización molecular de *Galba truncatula*, vector principal de la Fascioliasis, en Argentina. Implicaciones en salud pública. *Enfermedades Emergentes*, 9(2), 77–82.
- Becerra Rozo, W. M. (2009). Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. *Revista Colombiana de Ciencias ...*, 14(26), 28–35. <https://doi.org/July 7, 2013>
- Bello, M. (2011). Guía turística de Boyacá. *Ministerio de Industria y Comercio*, 76. Recuperado de http://www.colombia.travel/es/descargas/guias_turisticas/GUIA_BOYACA-web.pdf
- Bennema, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., Schnieder, T., Strube, C., Ducheyne, E., ...

- Charlier, J. (2009). The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 51–57.
<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.07.006>
- Bouchet, P., Rocroi, J.-P., Hausdorf, B., Kaim, A., Kano, Y., Nützel, A., ... Strong, E. E. (2017). Revised Classification, Nomenclator and Typification of Gastropod and Monoplacophoran Families. *Malacologia*, 61(1–2), 1–526. <https://doi.org/10.4002/040.061.0201>
- Brian Kendall, S. (1950). Snail Hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *Journal of Helminthology*, 24(1–2), 63–74. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00019131>
- Cabra Angel, A. M., & Herrera Huérfano, C. C. (2007). Estudio de prevalencia de la *Fasciola* hepática y Caracol *Lymnaea* spp. en predios del municipio de Simijaca Cundinamarca. Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/5606>
- Calienes, A. F., Fraga, J., Pointier, J. P., Yong, M., Sanchez, J., Coustau, C., ... Théron, A. (2004). Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, 92(1), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.05.014>
- Cañete, R., Yong, M., Sánchez, J., Wong, L., & Gutiérrez, A. (2004). Population dynamics of intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* and some environmental factors in San Juan y Martinez Municipality, Cuba. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3), 257–262.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300003>
- Carmona, C., & Tort, J. F. (2017). Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of Helminthology*, 91(02), 99–109.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X16000560>

- Caron, Y., Righi, S., Lempereur, L., Saegerman, C., & Losson, B. (2011). An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* sp. in lymnaeid snails. *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.020>
- Caron, Yannick, Celi-Erazo, M., Hurtrez-Boussès, S., Lounnas, M., Pointier, J.-P., Saegerman, C., ... Benítez-Ortíz, W. (2017). Is *Galba schirazensis* (Mollusca, Gastropoda) an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Ecuador? *Parasite*, 24, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017026>
- Carvalho, O. S., Cardoso, P. C., Lira, P. M., Rumi, A., Roche, A., Berne, E., ... Caldeira, R. L. (2004). *The Use of the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Technique Associated with the Classical Morphology for Characterization of Lymnaea columella, L. viatrix, and L. diaphana (Mollusca: Lymnaeidae)* (Vol. 99). Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v99n5/v99n5a08.pdf>
- Cordero del Campillo, M. (2001). *Parasitología veterinaria. Parasitología Veterinaria, 2000*, ISBN 84-486-0236-6, págs. 79-104. McGraw-Hill, Interamericana de España. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3856544>
- Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., ... Hurtrez-Boussès, S. (2010). Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 381. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-381>
- Correa, A. C., Escobar, J. S., Noya, O., Velásquez, L. E., González-Ramírez, C., Hurtrez-Boussès, S., & Pointier, J. P. (2011). Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1978–1988. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.003>

- Cruiz-Reyes, A., & Malek, E. A. (1987). Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 24(3–4), 203–210.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(87\)90041-0](https://doi.org/10.1016/0304-4017(87)90041-0)
- Cucher, M. A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbé, J. H., & Wisnivesky-Colli, C. (2006). PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), 74–82.
<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2005.12.013>
- Dalton JP. (1999). *Fasciolosis*. (U. Wallingford Oxon OX10 8DE, Ed.), *CABI Publishing Series*.
- Dayrat, B., Conrad, M., Balayan, S., White, T. R., Albrecht, C., Golding, R., ... de Frias Martins, A. M. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of pulmonate gastropods (Mollusca): New insights from increased taxon sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(2), 425–437. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.02.014>
- Dreyfuss, G., Abrous, M., & Rondelaud, D. (2000). The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 86(1), 158–160.
[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0158:TSOLFT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0158:TSOLFT]2.0.CO;2)
- Dreyfuss, G., Correa, A. C., Djuikwo-Teukeng, F. F., Novobilský, A., Höglund, J., Pankrác, J., ... Rondelaud, D. (2015). Differences in the compatibility of infection between the liver flukes *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in a Colombian population of the snail *Galba* sp. *Journal of Helminthology*, 89(6), 720–726.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X14000509>
- Esteban, J. Guillermo, González, C., Bargues, M. D., Angles, R., Sánchez, C., Náquira, C., & Mas-Coma, S. (2002). High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Tropical Medicine and International Health*, 7(4), 339–348.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00870.x>

Esteban, José Guillermo, Flores, A., Aguirre, C., Strauss, W., Angles, R., & Mas-Coma, S.

(1997). Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 66(1), 1–14.

[https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00669-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00669-4)

Estrada, Vi. ., Gómez, M., & Velasquez, L. (2006). Cattle hygiene and bovine fasciolosis.

Medellín and Rionegro 1914-1970. *Iatreia*, 19(4), 393–407. Recuperado de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-

07932006000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

Frankel, R., & Galun, E. (1977). Autogamy (pp. 51–78). <https://doi.org/10.1007/978-3-642->

81059-6_2

Fuentes Beltrán, Y. M., Sierra Balcárcel, R. F., & Uribe Delgado, N. (2012). *Determinación de*

la proporción de Fasciolosis en bovinos y ovinos en las veredas Mortiño y Jurado del

municipio del cerrito en Santander. Revista de la Universidad Industrial de Santander.

Salud (Vol. 44). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud. Recuperado de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072012000300016

González, L. C., Esteban, J. G., BARGUES, M. D., Valero, M. A., Ortiz, P., Náquira, C., & Mas-

Coma, S. (2011). Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal

transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica*, 120(1–2), 119–129.

<https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2011.07.002>

Gutiérrez, A., Vázquez, A. A., Hevia, Y., Sánchez, J., Correa, A. C., Hurtrez-Boussès, S., ...

Théron, A. (2011). First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of

Pseudosuccinea columella from Cuba and the Caribbean. *Journal of helminthology*, 85(1),

109–111. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000350>

- Houin, R. (2004). La Lutte Contre La Fasciolose. *Epidémiologie et santé animale*, 46, 57–62.
- Hubendick B. (1951). Recent Lymnaeidae, their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *Kungl Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 3, 1–223.
- Hussein, A.-N. A., Hassan, I. M., & Khalifa, R. M. A. (2010). Description of Eggs and Larval Stages of Fasciola, Light and Scanning Electron Microscopic Studies. *Research Journal of Parasitology*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.3923/jp.2010.1.12>
- Jabbour-Zahab, R., Pointier, J., Jourdane, J., Jarne, P., Oviedo, J., Mas-Coma, S., ... Renaud, F. (1997). *Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano*. *Acta Tropica* (Vol. 64). Recuperado de https://ac.els-cdn.com/S0001706X96006316/1-s2.0-S0001706X96006316-main.pdf?_tid=b797569a-f35d-42f9-9d47-9596c3c73076&acdnat=1543878199_ebea5ddeb7d1207b7f305a22f9286c6a
- Kuerpick, B., Fiedor, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Schnieder, T., & Strube, C. (2012). Bulk milk-estimated seroprevalence of Fasciola hepatica in dairy herds and collecting of risk factor data in East Frisia, northern Germany. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 125(7–8), 345–350. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919929>
- Lounnas, M., Correa, A. C., Vázquez, A. A., Dia, A., Escobar, J. S., Nicot, A., ... Hurtrez-Boussès, S. (2017). Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of Pseudosuccinea columella at the worldwide scale. *Molecular Ecology*, 26(3), 887–903. <https://doi.org/10.1111/mec.13984>

- Lounnas, Manon, Correa, A. C., Alda, P., David, P., Dubois, M.-P., Calvopina, M., ... Hurtrez-Boussès, S. (2017). Population structure and genetic diversity in the invasive freshwater snail *Galba schirazensis* (Lymnaeidae). *Canadian Journal of Zoology*, 435(November 2017), cjz-2016-0319. <https://doi.org/10.1139/cjz-2016-0319>
- Lounnas, Manon, Vázquez, A. A., Alda, P., Sartori, K., Pointier, J.-P., David, P., & Hurtrez-Boussès, S. (2017). Isolation, characterization and population-genetic analysis of microsatellite loci in the freshwater snail *Galba cubensis* (Lymnaeidae). *Journal of Molluscan Studies*, 83(1), 63–68. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyw041>
- Mas-Coma, S. (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology*, 79(03), 207–216. <https://doi.org/10.1079/JOH2005296>
- Mas-Coma, S., Anglés, R., Esteban, J. G., Bargues, M. D., Buchon, P., Franken, M., & Strauss, W. (1999). The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine & International Health*, 4(6), 454–467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00418.x>
- McCann, C. M., Baylis, M., & Williams, D. J. L. (2010). Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. *The Veterinary record*, 166(20), 612–617. <https://doi.org/10.1136/vr.b4836>
- McKown, R. D., & Ridley, R. K. (1995). Distribution of fasciolosis in Kansas, with results of experimental snail susceptibility studies. *Veterinary Parasitology*, 56(4), 281–291. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00688-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00688-9)
- Mehmood, K., Zhang, H., Sabir, A. J., Abbas, R. Z., Ijaz, M., Durrani, A. Z., ... Li, J. (2017). A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microbial Pathogenesis*, 109, 253–262.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.006>

Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., & Ubeira, F. M. (2008). Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 157(3–4), 235–243. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.07.032>

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2013). Atlas de páramos de Colombia 2013.

Recuperado de <http://www.humboldt.org.co/es/component/k2/item/551-atlas-de-paramos-de-colombia-2013?highlight=YToxOntpOjA7czo4OiJww6FyYW1vcyI7fQ==>

Ministerio de Comercio, I. y T. (2012). Santander Colombia, Guía Turística, 100.

OHARI, Y., HAYASHI, K., MOHANTA, U. K., KUWAHARA, Y., & ITAGAKI, T. (2017).

First report of *Fasciola* larva infection in *Galba truncatula* (Müller, 1774) (Gastropoda, Lymnaeidae) occurring in the natural environment in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(8), 1381–1383. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0215>

Palma, L., Ricardo, P., & Roza, W. B. (2014). Prevalencia de fasciolosis humana y bovina en una hacienda de la Lejía, Municipio de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS*, 11(1).

<https://doi.org/10.24054/01204211.V1.N1.2013.839>

Paraense, W. L. (1983). *Lymnaea columella* in northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78(4), 477–482. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761983000400011>

Paraense, W. L. (2003). Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Peru (Mollusca :

Basommatophora), 98(May), 767–771. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2010.02.002>

Paraense, W. L. (2004). Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca:

Basommatophora). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(4), 357–362.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400003>

Paraense, W. L. (2005). Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Argentina (Mollusca:

Basommatophora). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5), 491–493.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000500008>

Pointier, J-P, & Giboda, M. (1999). The Case for Biological Control of Snail Intermediate Hosts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Today*, 15(10), 395–397.

[https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01517-3](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01517-3)

Pointier, J. ., & David, P. (2004). Biological control of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomes, by *Marisa cornuarietis* in ponds of Guadeloupe: long-term impact on the local snail fauna and aquatic flora. *Biological Control*, 29(1), 81–89.

[https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00137-3)

Pointier, J. P., Cazzaniga, N. J., González-Salas, C., Gutiérrez, A., Arenas, J. A., Bargues, M. D., & Mas-Coma, S. (2006). Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), 431–435. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000400015>

Pointier, J. P., Noya, O., de Noya, B. A., & Théron, A. (2009). Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(5), 790–796. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500022>

Pointier, Jean-Pierre, & Alarcón de Noya, B. (2014). *Freshwater molluscs of Venezuela and their medical and veterinary importance*. ConchBooks. Recuperado de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01137899>

Puslednik, L., Ponder, W. F., Dowton, M., & Davis, A. R. (2009). Examining the phylogeny of

- the Australasian Lymnaeidae (Heterobranchia: Pulmonata: Gastropoda) using mitochondrial, nuclear and morphological markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(3), 643–659. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.03.033>
- Rapsch, C., Schweizer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., ... Torgerson, P. R. (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36(10–11), 1153–1158. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2006.06.001>
- Recalde-Reyes, D. P., Padilla Sanabria, L., Giraldo Giraldo, M. I., Toro Segovia, L. J., Gonzalez, M. M., & Castaño Osorio, J. C. (2014). Prevalence of *Fasciola hepatica* in humans and cattle in the department of Quindio-Colombia 2012-2013. *Infectio*, 18(4), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.09.001>
- Remigio, E. (2002). Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: Insights from broader taxon sampling. *Parasitology Research*, 88(7), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0658-8>
- Remigio, Elpidio A., & Hebert, P. D. N. (2003). Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 641–647. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00140-4)
- Remigio, Elpidio A., & Blair, D. (1997). Molecular systematics of the freshwater snail family lymnaeidae (Pulmonata: Basommatophora) utilising mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Journal of Molluscan Studies*, 63(2), 173–185. <https://doi.org/10.1093/mollus/63.2.173>
- Rim, H.-J., Farag, H. F., Sornmani, S., & Cross, J. H. (s/f). *Food-borne Trematodes: Ignored or*

- Emerging?* (Vol. 10). Recuperado de <https://eurekamag.com/pdf/002/002385792.pdf>
- Rokni, M. B., Massoud, J., O'Neill, S. M., Parkinson, M., & Dalton, J. P. (2002). Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: Application of cathepsin L-ELISA. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(2), 175–179.
[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00431-5](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00431-5)
- Rondelaud, D., Vignoles, P., & Dreyfuss, G. (2004). Fasciola hepatica: the developmental patterns of redial generations in naturally infected Galba truncatula. *Parasitology Research*, 94(3), 183–187. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1191-8>
- Schell SC. (1985). Handbook of the Trematodes of North America north of Mexico. *Journal of Helminthology*, 61(01), 18. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00009652>
- Schweizer, G., Braun, U., Deplazes, P., & Torgerson, P. R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 157(7), 188–193.
<https://doi.org/10.1136/vr.157.7.188>
- Smith, D. G. (Douglas G. (2001). *Pennak's freshwater invertebrates of the United States : Porifera to Crustacea*. J. Wiley. Recuperado de <https://www.wiley.com/en-us/Pennak%27s+Freshwater+Invertebrates+of+the+United+States%3A+Porifera+to+Crustacea%2C+4th+Edition-p-9780471358374>
- Strong, E. E., Gargominy, O., Ponder, W. F., & Bouchet, P. (2008). Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 149–166.
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-9012-6>
- T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. (s/f). Recuperado de www.nanodrop.com
- Technology, M. (2007). BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE,

- (4337035), 1–274. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0140>
- Uribe, N., Becerra, W. M., & Velásquez, L. E. (2014). *Lymnaea cousini*, huésped de *Fasciola hepatica* en el trópico alto andino de Colombia, 598–604.
- Uribe, N., Pereira, A., & Jean-Pierre, P. (2017). *Foco de fasciolosis en Colombia asociado a Galba cousini*. Santiago de Chile. Recuperado de <http://flap2017.com/wp-content/uploads/2018/01/LIBRO-DE-RESUMENES-FLAP-XXIV-CHILE-DICIEMBRE-2017..pdf>
- Vázquez, A. A., Sánchez, J., Pointier, J. P., Théron, A., & Hurtrez-Boussès, S. (2014). *Fasciola hepatica* in Cuba: Compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *Journal of Helminthology*, 88(4), 434–440. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000382>
- Velásquez, L. E. (2006). Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7), 795–799. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700015>
- Velásquez, L. E. (2011). Diferenciación específica de limneidos en Colombia, utilizando el gen de la citocromo oxidasa I. *Biomédica*, 31(sup3.2), 203. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i0.484>
- Vignoles, P., Dreyfuss, G., & Rondelaud D.*. (2002). Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *Journal of Helminthology*, 76(3), 269–272. <https://doi.org/10.1079/JOH2002118>
- Wilches, C., Jaramillo, J. G., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., & Vélez, I. D. (2009). Presencia de infestación por *Fasciola hepatica* en habitantes del valle de San Nicolás, oriente antioqueño. *Infectio*, 13(2), 92–99. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70730-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70730-1)

Apéndices

A. Protocolo salidas de campo.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiología Molecular-GIEM

Línea de Parasitología humana y veterinaria

Protocolo para salidas de campo destinadas a la recolección de moluscos limneidos

2016

Andrés Esteban Pereira, Nelson Uribe Delgado.

Antes de la Salida:

- Concretar las veredas a visitar, el número de fincas, si hay posibilidad de muestrear ganado, el número de ganado a muestrear tanto general como discriminado por fincas. Contactar con personal técnico del municipio (preferiblemente del sector veterinario) o personas que conozcan las veredas y la problemática especialmente con fasciolosis y que pueda citar a los campesinos para una reunión informativa en la cual se cuadren las visitas.
- Confirmación de los participantes de la salida, realizado por lo menos con un mes de anticipación a la fecha de la salida, cerciorándose de la entrega de la documentación necesaria a Bienestar Universitario para que ellos autoricen la participación de cada alumno.
- Carta de permiso académico para estudiantes dirigida a la dirección de Escuela, con fecha de salida, identificación y nombre de la EPS de cada uno de los integrantes.

- Hacer los contactos mediante cartas o por vía telefónica con el Alcalde del municipio a muestrear, el encargado de la estación de policía para informar con antelación de nuestra visita evitando posteriores inconvenientes.
- Hacer las reservas necesarias para el transporte y hospedaje, en el pueblo y en la vereda donde se planee pasar la noche.
- Realizar el presupuesto del viaje, teniendo en cuenta los gastos de alojamiento, alimentación, transportes (Bus, expreso, motos, taxis).
- Preparar el material necesario (insumos, contenedores, herramientas de trabajo, material de protección, papelería e indumentaria), realizado con 8 días de anticipación a la fecha de salida.
- Equipar un botiquín con medicamentos para dolor de estómago, cabeza, musculares, gasas, vendas entre otros.

Búsqueda y Recolección de Caracoles:

Personal necesario: 2 personas.

Material necesario:

- | | |
|--|--------------------------------|
| • Tarros Plásticos para la recolección de Orina (1-5 Unid) | • Contenedor |
| • Colador metálico (1 Unid. Por persona) | • Guantes latex y veterinarios |
| • Colador plástico mediano (2 unid.) | • Servilletas (1-3 Unid) |
| • Plato de Contraste (1 Unid. Por persona) | • Cristales de Mentol |
| | • Alcohol 70° |
| | • Estufa eléctrica |
| | • Olleta para calentar agua |

- Impermeable
- Botas pantaneras
- Falcon 15/50 mL
- Parafilm y/o Vinipel
- Linternas ojalá de cabeza
- Termómetro/multímetro
- GPS
- Marcadores, lápices y lapiceros
- Cuaderno de apuntes
- Cámara fotográfica
- Pinzas finas y gruesas

Se localizarán zonas que reúnan las condiciones ideales para ser el hábitat del caracol, cada miembro debe realizar una búsqueda durante 30 minutos, si el tiempo se ha cumplido y no se encuentra ningún espécimen, se debe proceder a la siguiente posible zona de captura.

Si en cualquiera de los posibles hábitats, se encuentran especímenes de interés se recolectan en los tarros de orina en cantidad suficiente. En los tarros se deben depositar plantas y agua del lugar a fin de que estas sirvan como alimento a los caracoles mientras son transportados, en caso de no poder hacerlo, depositar un fragmento de servilleta y garantizar el oxígeno.

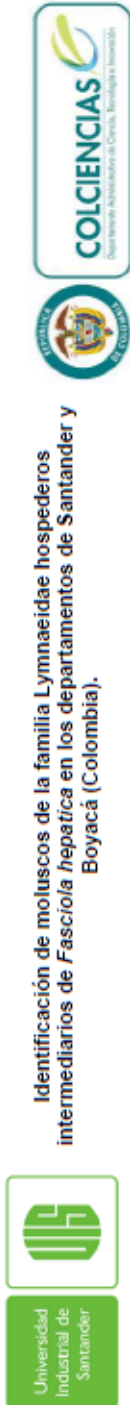
Los especímenes deben capturarse teniendo en cuenta los patrones morfológicos que permiten determinar si es el género de interés. Si se hallan caracoles, el trabajo se da por concluido y el predio se debe considerar como positivo para la presencia de caracoles del género *Lymnaea*. En caso de encontrar una especie que no concuerde con los patrones de identificación, se deben tomar unos cuanto especímenes para determinar la especie a la que pertenecen. Si se encuentran planorbidos también capturarlos y procesarlos igual que los limneidos.

Procesamiento de los caracoles

Clasificar los caracoles obtenidos por lugar de procedencia y por tamaño. Sumergir los caracoles en agua a 70°C durante un minuto o 50 segundos (según el tamaño) para relajarlos. Una vez estén relajados proceder a separar cuidadosamente los cuerpos de las conchas con ayuda de pinzas finas. Conservar los cuerpos en etanol absoluto previos lavados con etanol 70% para retirar suciedad; guardar las conchas. Rotular.

Conservación de los caracoles

Cuando no sea posible procesar los caracoles, se almacenan en los frascos plásticos, se mantienen con un poco de agua de la zona que se recolectó, y en la noche, se les coloca una capa de cristales de mentol al frasco, de tal manera que estos floten y cubran los caracoles que están en el fondo. Esto se deja toda la noche con el fin de que se relajen y puedan sacar el pie. Al día siguiente, se lavan y se depositan en el mismo frasco donde se almacenan con etanol absoluto sumergiéndolos en su totalidad de tal manera que se conserven, esto se realiza todas las mañanas hasta su utilización.



Departamento: _____ Provincia: _____ Municipio: _____ Fecha: _____

[illegible]



Identificación de especies de moluscos Lymnaeidae relacionadas con la transmisión de fasciolosis en Santander y Boyacá.

LÍNEA DE PARASITOLOGÍA HUMANA Y VETERINARIA – GRUPO GIEM
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FORMATO DE RECOLECCIÓN DE CARACOLIS LIMNEIDOS

Departamento: _____ Provincia: _____ Municipio: _____ Fecha: _____

Vereda	Finca	Altura (msnm)	Coordenadas		Temperatura (°C)		Descripción Terreno	Número de limneidos recolectados	Otros caracoles recolectados
			N	W	Máx.	Min.			

C. Protocolo de extracción de ADN.**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER****Grupo de investigación GIEM****Línea de Parasitología humana y veterinaria****Protocolo para la extracción de ADN en limneidos hospederos intermediarios de*****Fasciola hepatica* por Salting Out****Materiales**

- Microcentrífuga para viales
- Micropipeta de 1 µl, 10 µl y 1000µl
- Cajas de petri estériles y hojas de bisturí estériles
- Puntas azules, amarillas y blancas estériles
- Viales estériles (2 por muestra)
- Vórtex
- Nevera con congelador
- Bloque seco
- Buffer de lisis
- Solución SDS al 10% (dodecil sulfato de sodio- desnaturalización de proteínas)
- NaCl 6M o Acetato de sodio 5M
- Isopropanol
- Etanol al 70% para biología molecular
- Buffer TE 1x (solubilizar ADN o ARN, mientras que lo protege de la degradación)
- Gradilla para tubos viales
- Toallas de papel
- Elementos de bioseguridad (Guantes de nitrilo, tapabocas, gorro, bata)
- Frasco de descarte
- Marcador permanente
- Nanodrop 2000

- Tubos con EDTA
- Proteinasa K

Preparación de la muestra

1. Cortar la totalidad del pie del caracol si se dispone de varios, o un fragmento del pie si hay pocos caracoles y en una caja de Petri estéril, con ayuda de 2 lancetas estériles (hojas de bisturí) picar el tejido del pie del caracol muy finamente. Transferir el material a un vial estéril.

Proteólisis

2. Agregar 600 µL de Buffer de lisis (10 mM Tris HCL pH: 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl).
3. Agregar 10 µL SDS al 10%.
4. Agregar 17.5 uL de Proteinasa K (20 mg/ml).
5. Mezclar con vórtex por 15 minutos.
6. Incubar en bloque seco a 56 °C por 30 minutos o más hasta observar digestión completa del tejido, agitando en vórtex ocasionalmente cada 10 minutos.

Precipitación de proteínas

7. Añadir 150 µL de NaCl 6M o Acetato de Sodio 5M y mezclar en vórtex por 30 segundos.
8. Incubar por 5 minutos en frío (congelador) para ayudar a precipitar las proteínas.
9. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos.
10. Transferir el sobrenadante a un nuevo vial con cuidado de no remover el precipitado.

Precipitación del ADN

11. Añadir al sobrenadante 600 µL de Isopropanol (-20°C) y mezclar por inversión durante aproximadamente 1 minuto.
12. Centrifugar a 10000 rpm por 4 minutos. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no eliminar el precipitado.
13. Lavar con 200 µL de etanol al 70 % para biología molecular. Centrifugar a 10000 rpm por 4 minutos y eliminar el sobrenadante por inversión. Escurrir la boca del vial contra una toalla de papel limpia.
14. Dejar secar toda la noche o colocar en el bloque seco a 56°C con la tapa abierta por una hora. (Para evitar contaminaciones poner una toalla de papel limpia sobre los viales).

Conservación del ADN

15. Resuspender el ADN en 50µl de Buffer TE 1x, incubar en bloque seco a 56°C por 30 minutos. Almacenar a -20°C.

Cuantificación del ADN

16. Prender el Nanodrop 2000 y el computador. Abrir el software del Nanodrop 2000 y seleccionar la opción “Ácidos nucleicos”.
17. Lavar el equipo con 3 µL de agua ultrapura, limpiar con toalla de papel.
18. Blanquear con 1 µL de solución con la cual se resuspendió el ADN (TE 1X), limpiar con toalla de papel.
19. Medir usando 1 µL de muestra de ADN (Dar vórtex a las muestras antes de medir), limpiar con toalla de papel. Dar un nombre en el software antes de medir.

20. Limpiar el equipo con 3 μ L de agua ultrapura y limpiar con toalla de papel.
21. Guardar el archivo con las mediciones.
22. Referencias: Relación 260/280: > 1.8 , relación 260/230: > 2.0 , Cantidad: > 100 ng

Realizado por: Grupo GIEM. Adaptado por: Andrés Esteban Pereira. Revisado por: Nelson Uribe Delgado. 2016

D. Protocolo de amplificación de ADN de limneidos.

LINEA DE INVESTIGACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ENFERMEDADES
CAUSADAS POR TREMATODOS

3

PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE MOLUSCOS

LOCUS CO1

LC01490 Forward

HCO2198 Reverse

Materiales y Equipos

- Tampón 5X
- MgCl₂ 25 mM
- dNTP 1/10
- Primer forward
- Primer Reverse
- Taq Polimerasa
- Agua miliquio estéril
- Termociclador
- Vortex
- Micropipetas 0.1 a 10 µl, 10 a 100 µl
- Puntas estériles blancas y amarillas
- Tubos eppendorf 1.5 ml estériles
- Tubos de PCR estériles
- Soportes
- Alcohol
- Servilletas
- Cámara de flujo laminar
- Centrifuga
- Bloque seco

	Para 1 tubo	Para X tubos
H ₂ O estéril	13.6 µl	
Tampón 5X	5 µl	
MgCl ₂ 25mM	3 µl	
dNTP Mix 1/10°	1 µl	
Primer Forward (10 pmol)	1 µl	
Primer Reverse (10 pmol)	1 µl	
TAQ (PROMEGA)	0.4 µl	

25 µl de Mix + 2 µl ADN

- Colocar el ADN en el bloque seco a 60°C (no se puede pasar de esta temperatura porque se puede desnaturalizar).
- Limpio la cabina con alcohol, coloco la luz UV por 20 minutos con las puntas, los guantes, soportes, tubos PCR y eppendorf y las micropipetas.
- Dar vortex a todos los reactivos.
- En un tubo eppendorf de 1.5 ml preparo "mezcla de la reacción" o Master que contiene todos los componentes necesarios para iniciar la PCR. Primero adiciono el agua estéril, Buffer, MgCl₂, dNTP, Primers forward y reverse y la Taq Polimerasa que debe agregarse al final de la preparación de la mezcla. Doy vortex al final.

LINEA DE INVESTIGACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR TREMATODOS

4

- 5. Se debe incluir un control negativo, 2µl agua estéril. El agua mQ estéril que solamente se utiliza para experimentos de PCR, se debe renovar frecuentemente, y mantener en recipientes de pequeño volumen, se utiliza para los controles negativos.
- 6. Marcar los tubos para PCR y agregar el volumen 25 ul de la Mix menos el ADN.
- 7. Hacer un Pin 0: centrifugar el vial de ADN a revoluciones altas para concentrarlo.
- 8. Adicionar el ADN.
- 9. Llevar al termociclador, fijarse que estén bien tapados los tubos.
- 10. Enciendo y selecciono el ciclo.

Tm=50°C

1 cycle	40 ciclos	1 ciclo	1 ciclo
95°C : 5 min	95°C : 1min	72°C : 10 min	4°C luego End
(step 1)	(step 2)	(step 6)	
	50°C : 1min 10sec		
	(step 3)		
	72°C :1min 30 sec		
	(step4)		
	(step 5 : goto step 2,		
	39 times)		

LOCUS ITS1 - ITS2

Tm=50°C

1 ciclo	30 ciclos	1 ciclo	1 ciclo
94°C : 2 min	94°C 30sec	72°C : 7 min	4°C luego End
(step 1)	(step 2)	(step 6)	
	50°C : 30 sec		
	(step 3)		
	72°C :1min 30 sec		
	(step4)		
	(step 5 : goto step 2,		
	29 times)		

CÁLCULOS PARA PCR

- **Buffer de PCR**

Constituido por: 10 mM de Tris HCl pH: 8.3

500 mM KCL

20 mM de MgCl₂

El buffer viene listo para trabajar, por lo tanto, necesitamos preparar la concentración final que necesitamos. Para esto realizamos los siguientes cálculos:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$5X \cdot V1 = 1X \cdot 25 \mu\text{L}$$

$$V1 = 5 \mu\text{L}$$

Entonces, necesitamos 5 μL del buffer para que nos quede una concentración final de 1X en 25 μL de volumen.

- **d NTPs Desoxirribonucleótidos trifosfatados**

La solución Stock viene con concentración de 100 mM. Se realizan los siguientes cálculos:

SOLUCIÓN DE TRABAJO:

Se debe preparar una solución de 100 μL con una concentración de 10 mM de cada nucleótido: A, T, G, C.

Para 1 d NTP (Adenina): $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$V1 \cdot 100 \text{ Mm} = 100 \mu\text{L} \cdot 10 \text{ mM}$$

$$V1 = 10 \mu\text{L}$$

Esto se realiza con cada uno, y nos va a dar un volumen de 10 μL de cada d NTP. Por lo tanto, la suma de los 4 (10 μL A + 10 μL G + 10 μL C + 10 μL G) me da 40 μL d NTPs y le agrego 60 μL de agua, para completar la solución de trabajo de 100 μL .

SOLUCIÓN FINAL:

Se debe preparar una solución de 25 μL con una concentración de 200 μM .

1 mM equivale a 1000 μM

Por lo tanto, 200 μM equivale a 0.2 mM.

Después de convertir a las unidades que necesitamos, realizamos:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$V1 \cdot 10 \text{ mM} = 0.2 \text{ Mm} \cdot 25 \mu\text{L}$$

$$V1 = 0.5 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, necesitamos 0.5 μL de la solución de trabajo 10 mM d NTPs para que la concentración final sea 200 μM .

- **Primers forward and reverse**

Cuando envío a sintetizar los cebadores, estos me llegan liofilizados en las unidades de concentración de nMoles. Es por esto, que debo resuspenderlos.

Un ejemplo de esto:

Me llevo un cebador con 102.8 nmoles

$$102.8 \text{ nMoles} \rightarrow 102.8 \cdot 10^{-9} \text{ moles} \times \frac{1 \text{ L s/n}}{100 \cdot 10^{-6} \text{ moles}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} =$$

= 1028 μL de H₂O estéril, para reconstituir los oligonucleótidos.

Entonces, la solución Stock contiene una concentración de 100 μM de cebadores.

SOLUCIÓN DE TRABAJO:

La solución de trabajo debe tener una concentración de 10 μM con un volumen de 100 μL .

Entonces:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$V1 \cdot 100 \mu\text{M} = 10 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{L}$$

$$V1 = 10 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, debo tomar 10 μL de la solución Stock y 90 μL de H₂O destilada estéril para preparar la solución de trabajo de 100 μL .

SOLUCIÓN FINAL:

Se debe preparar una solución de 25 μL a $\frac{10 \text{ pmol}}{\mu\text{L}}$

$$C = \frac{\text{Solute}}{\text{Solución}} = \frac{10 \text{ pmol}}{25 \mu\text{L}} = 0.4 \text{ pmol}/\mu\text{L}$$

$$0.4 \cdot 10^{-12} \frac{\text{Mol}}{\mu\text{L}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 4 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/L}$$

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

LINEA DE INVESTIGACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ENFERMEDADES
CAUSADAS POR TREMATODOS

7

$$V1 * 10 * 10^{-6} \text{ Mol/L} = 4 * 10^{-7} \text{ Mol/L} * 25 \mu\text{L}$$
$$V1 = 1 \mu\text{L}$$

Se utilizan 1 μL de cada oligonucleótido para un volumen final de 25 μL .

- **ENZIMA TAQ POLIMERASA**

$$\begin{array}{ccc} 5\text{U} & \longrightarrow & 1 \mu\text{L} \\ 1 \text{ U} & & X \end{array}$$

$$X = 0.2 \mu\text{L}$$

Se debe tomar 0.2 μL de la enzima para un volumen final de 25 μL .

PROTOCOLO PARA ELECTROFORESIS DEL ADN AMPLIFICADO DE MOLUSCOS

Materiales y reactivos

- Agarosa
- Espátula
- Balanza analítica
- Papel Aluminio
- Vaso de precipitado
- Horno microondas
- Cámara de electroforesis vertical
- Cinta de enmascarar
- Papel-parafilm
- Micropipetas 0.5 -10 uL y de 10 – 100 uL
- Puntas blancas y amarillas
- Buffer de carga
- Marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb
- SYBR safe
- Agua destilada
- Buffer TAE (Tris, EDTA, Ácido Acético)
- Probeta de 100 ml

1. Preparar 80 ml de gel de agarosa al 1.5%. Pesar 1.2 g de agarosa.
2. Disolver la agarosa en 85 ml de Buffer TAE al 1X.
3. Mezclar y llevar al microondas por 60 segundos.
4. Agregar 8 µL de SYBR safe.
5. Calentar en el microondas por 20 segundos más.
6. Depositar sobre el soporte (previamente envuelto en cinta de enmascarar), y enseguida introducir la regla de los pozos. Esperar a que se gelifique el gel.
7. Retirar la regla de los pozos. Trasladar el gel a la cámara de electroforesis y ubicarlo de tal manera que las muestras corran del polo negativo o cable negro al polo positivo o cable rojo. Cubrir con buffer de carga o corrido.
8. En papel parafilm, servir 5 uL de buffer de carga, por cada muestra a sembrar. Se sirve de muestra 2 uL del amplificado o más.
9. Sembrar en el primer pozo 2uL del marcador de peso molecular. En el siguiente pozo el control negativo y en seguida las muestras.
10. Cerrar la cámara, conectar los cables y encender la cámara.
11. Dejar correr 100 voltios por 40 minutos.
12. Visualizar el gel en la cámara con luz UV. Tomar fotografía.