



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**Trematodos Schistosomatidae en Anseriformes y
moluscos dulceacuícolas del centro y sur de Chile:
Agentes de la dermatitis cercarial humana**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

PABLO ENRIQUE OYARZÚN RUIZ
CHILLÁN-CHILE
2022

Profesor Guía: Lucila del Carmen Moreno Salas
Dpto. de Zoología
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Lucila Moreno Salas
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Fabiana Drago
Museo de La Plata
División Zoología Invertebrados
Universidad Nacional de La Plata



Dr. Patricio Torres Hevia
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Dr. Carlos Landaeta Aqueveque
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Fidel Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer al profesor Daniel González Acuña, quien sin conocerme me recibió en el laboratorio y apoyó inmediatamente sin más condición que trabajar en lo que me apasiona; los parásitos de la fauna silvestre. Le estaré siempre agradecido, Doc. A Karen Ardiles y Sofía, alias “la peque”, por la buena onda y las risas que pudimos compartir en los distintos terrenos.

A Martín Zamorano, Valentina Aravena y Lucas Aravena, quienes junto a varios estudiantes de pregrado me acompañaron a coleccionar los patos y caracoles con excelente disposición, incluso haciendo necropsias hasta muy tarde y siempre con la alegría y energía que los caracteriza, gracias chiquillos, serán grandes profesionales. Así mismo a Nicole Lizama, Nicole Inostroza y Melissa Cárcamo quienes me ayudaron en los terrenos buscando los caracoles. También a Paulina Sepúlveda y Javier Paineán quienes además de ayudarme en las colectas, me apoyaron en la búsqueda del material bibliográfico antiquísimo que sólo estaba disponible en papel. A Nicolás Martín y sus perritas, un colega y cazador comprometido con la fauna silvestre, siempre acompañando las salidas de terreno con sus historias con un final gracioso. A Carolina Silva por acompañarme esas largas tardes tomando las fotografías en el microscopio electrónico de barrido, y por supuesto la infaltable conversación con cafecito colombiano junto a Diana Echeverry y Felipe “Parcerero” Peña, gracias por las risas y buena onda. Al personal de Cendyr Náutico y a la Municipalidad de San Pedro de la Paz por su excelente disposición en recibir y mostrar interés por este proyecto.

A Lucila Moreno, primero por haberme recibido como su tesista y segundo por su excelente disposición, por apoyarme con ideas, críticas constructivas, su humor y los cafés cargados. A la comisión evaluadora, quienes con su excelente disposición, aportes y comprensión me ayudaron a sacar adelante este proyecto. A Richard Thomas y Adriana Santodomingo, mis maestros de las técnicas moleculares, muchas gracias por todo el tiempo invertido en mi formación y por responder cada consulta (que no fueron pocas). Realmente fue una fortuna haber coincidido, que grandes maestros y amigos son. También a las Drs. Margarita Ostrowski de Núñez, Fabiana Drago y Sara Brant por compartir su vasto conocimiento en platelmintos sin mayores condiciones, y por supuesto compartir la emoción de trabajar con los parásitos, qué ganas de llegar a ser como ustedes. A la Agencia Nacional

de Investigación y Desarrollo (ANID) quienes mediante la beca de Doctorado Nacional financiaron mi doctorado en la Universidad de Concepción.

Finalmente, y no menos importante, a mi familia: mis padres y hermanas, quienes desde que tengo memoria me han apoyado en mis ideas, a pesar de lo complicado que fueran los tiempos, pero siempre presentes y guiándome. De ustedes saco aprendizaje para ser un buen padre, pero sobre todo un ser humano de bien. A mi hija, Violeta, que con su radiante energía, su alegría, sus chistes, su amor, su todo, me acompañó día a día en la formulación y escritura de esta tesis de doctorado, sin saberlo, emocionándose tanto como yo cuando le contaba mis hallazgos. Cuán fructíferos resultaron tus “por qué”. Te amo hija.





"Mis sueños son mentiras que algún día dejarán de serlo" – Nach

RESUMEN

Los esquistosomas son trematodos sanguíneos de la familia Schistosomatidae, compuesto por 13 géneros parasitando aves dulceacuícolas y marinas como sus hospederos definitivos, y caracoles acuáticos como hospederos intermediarios. Son responsables de un cuadro zoonótico conocido como dermatitis cercarial (DC), el cual ocurre por la penetración de furcocercarias liberadas por los caracoles hospederos. El género *Trichobilharzia* es considerado el mayor responsable de los brotes de DC en seres humanos en el mundo. Estos trematodos han sido ampliamente estudiados en el hemisferio Norte, donde se han determinado áreas de endemia de la parasitosis, y recientemente se ha planteado como una enfermedad re-emergente, o incluso emergente en áreas de poca atención. Esto último es el escenario existente en el Neotrópico, donde las principales investigaciones sólo provienen de Argentina y Brasil, no obstante, la sistemática de estos parásitos sigue siendo, en general, pobremente abarcada. Si bien en Chile existe un brote de dermatitis cercarial reportado, y otros dos registros de esquistosomas en aves silvestres, la identificación específica de dichos esquistosomas en cada caso es desconocido a la fecha.

En la presente tesis doctoral se plantearon dos hipótesis: (1) "Si la mayoría de los registros de esquistosomas aviáres en Sudamérica provienen de la familia Chiliniidae, entonces los hospederos intermediarios de estos trematodos en los sitios a muestrear en las zonas centro y sur de Chile corresponden a representantes de dicha familia" y (2) "Teniendo en consideración la especificidad de los esquistosomas aviáres entre diferentes especies de anátidos, las comunidades de esquistosomas de patos y cisnes de cuello negro son distintas". Para poner a prueba ambas hipótesis, se colectaron un total de 2284 caracoles dulceacuícolas de cinco familias provenientes de las regiones del Ñuble, Biobío y Los Ríos. Estos fueron estimulados para liberación cercarial y diseccionados para determinar la presencia de esporoquistes. Además, con el fin de determinar la presencia de esquistosomas viscerales como nasales, se realizó la necropsia parasitaria de 95 anátidos de cinco especies distintas procedentes de las regiones antes mencionadas. Los parásitos colectados fueron caracterizados morfológica y molecularmente considerando los genes 28S y COI. Del total de caracoles analizados, 35 caracoles de la especie *Chilina dombeyana* (Chiliniidae) (Prevalencia= 1,53%) provenientes de la Laguna Chica de San Pedro (región del Biobío) resultaron parasitados con tres linajes distintos de esquistosomas aviáres (Linajes I, II y III),

dos de los cuales (I y II) fueron caracterizados molecularmente. Esta prevalencia coincide con lo reportado previamente en otras áreas geográficas. Desde el punto de vista filogenético, el Linaje I fue conespecífico con un taxón descrito desde *Cygnus melancoryphus* en Argentina, *Nasubilharzia melancorhypha*. Mientras que el Linaje II no formó parte de ningún clado de género conocido y, por lo tanto, con el potencial de corresponder a un taxón nuevo. En el caso de las aves, 58 (Prevalencia= 61,05%) de ellas albergaron esquistosomas, con cada especie resultando parasitada con al menos un taxón de esquistosoma aviar visceral y/o nasal. En el caso de los viscerales se describieron cinco taxones para el género *Trichobilharzia* y cuatro para *Dendritobilharzia*. Mientras que en los nasales se describió un taxón del género *Trichobilharzia* y otro de *Nasubilharzia*. Todos los taxones descritos, con excepción de los relacionados a *Dendritobilharzia*, obtuvieron soportes robustos en los análisis filogenéticos de ambos genes. Además, se expandió la distribución geográfica conocida de *Trichobilharzia querquedulae* y *N. melancorhypha* a Chile. Así mismo, se entrega evidencia sobre la especificidad de ciertos esquistosomas descritos hacia sus hospederos definitivos: *Trichobilharzia* sp. 4-*Mareca sibilatrix*, *T. querquedulae*-*Spatula cyanoptera* y *N. melancorhypha*-*C. melancoryphus*, lo cual fue soportado filogenéticamente. Adicionalmente, se plantea la necesidad de análisis filogenéticos adicionales para los taxones de *Dendritobilharzia*, género que ha resultado históricamente conflictivo desde el punto de vista morfológico, contando desafortunadamente con escasas secuencias de ADN para su comparación. En relación con los ciclos biológicos, se lograron dilucidar dos ciclos biológicos, indicando al menos un hospedero definitivo y uno intermediario para cada uno; el de *N. melancorhypha*, aislado desde *C. melancoryphus* y *C. dombeyana*, y el de un taxón aún pendiente por describir aislado desde los mismos dos hospederos.

Es importante mencionar que en esta tesis doctoral se logró la caracterización de nueve taxones con el potencial de corresponder a nuevas especies para la familia Schistosomatidae, los cuales fueron colectados desde las cinco especies de anátidos muestreados. Este notable registro plantea la necesidad de continuar la investigación de los esquistosomas aviares, cuya diversidad está evidentemente subestimada.

Acorde a los resultados obtenidos, ambas hipótesis fueron aceptadas. Además, este estudio corresponde a la primera caracterización morfológica como molecular de los esquistosomas aviares presentes en Chile, entregándose evidencia adicional a este grupo

escasamente estudiado en el continente Sudamericano, además de aportar a la discusión sobre la especificidad de estos parásitos hacia sus hospederos aviares.

Palabras clave: Digenea, Schistosomatidae, Anseriformes, zoonosis, Neotrópico.



ABSTRACT

Schistosomes are blood trematodes belonging to family Schistosomatidae and is composed by 13 genera parasitizing freshwater and marine birds as their definitive hosts, and aquatic snails as intermediate hosts. These parasites are responsible of a zoonotic illness called cercarial dermatitis (CD), which occurs after the penetration of furcocercariae released by the snail hosts. Genus *Trichobilharzia* is considered the major responsible of CD outbreaks around the world. These trematodes have been widely studied in the northern hemisphere where endemic areas have been established, and recently it has been proposed as a re-emerging disease, even as an emerging disease in areas with scarce research. The latter is the scenario present in the Neotropics, where most of the research has been led by Argentina and Brazil, however, the systematics of these parasites remains, in general, poorly understood. Even though in Chile there is a recorded outbreak of CD, and other two records of avian schistosomes in wild birds, the specific identity of such schistosomes remains unknown until present.

In the present doctoral thesis, two hypotheses were stated: (1) “If most of the records of avian schistosomes in South America come from family Chiliniidae, then, the intermediate hosts for these trematodes in the study areas from Central and Southern Chile correspond to members of that family” and (2) “Taking into consideration the specificity of avian schistosomes among different species of anatid birds, the schistosome communities of ducks and black-necked swans are different”. To test both hypotheses, a total of 2284 freshwater snails of five different families from Ñuble, Biobío and Los Ríos region were collected. These snails were stimulated for cercarial release and dissected to determine the presence of sporocysts. Besides, to determine the presence of visceral and nasal schistosomes, the parasitic necropsy of 95 anatid birds of diverse different species coming from the same regions above mentioned, was performed. The collected parasites were morphologically and molecularly, considering genes 28S and COI, characterized. From the whole analyzed snails, 35 snails of the species *Chilina dombeyana* (Chiliniidae) (Prevalence= 1.53%) from Laguna Chica de San Pedro (Biobío region) resulted parasitized by three different lineages of avian schistosomes (Lineages I, II and III), two of which were molecularly characterized. This prevalence agrees with previous reports from elsewhere around the world. From the phylogenetic perspective, Lineage I was conspecific with a taxon described in *Cygnus*

melancoryphus from Argentina, *Nasusbilharzia melancorhypha*. Meanwhile, Lineage II did not fit with any clade of known genera, thus, with the potential to correspond to a new taxon. From the whole analyzed birds, 58 (Prevalence= 61.05%) anatids hosted schistosomes, with every avian species being parasitized by one taxon of visceral and/or nasal schistosome, at least. In the case of visceral schistosomes, a total of five taxa for genus *Trichobilharzia* and four taxa for *Dendritobilharzia* were described. Meanwhile, for nasal schistosomes one taxon for *Trichobilharzia* and other for *Nasusbilharzia* were described. All described taxa, except for those from *Dendritobilharzia*, got robust supports in the phylogenetic analyses for both genes. Furthermore, the geographic distribution of *Trichobilharzia querquedulae* and *N. melancorhypha* was expanded to Chile. Similarly, evidence regard specificity of avian schistosomes to their definitive hosts is given in some of the reported taxa: *Trichobilharzia* sp. 4-*Mareca sibilatrix*, *T. querquedulae*-*Spatula cyanoptera* and *N. melancorhypha*-*C. melancoryphus*, which was phylogenetically supported. In addition, the need for additional phylogenetic analyses is proposed for *Dendritobilharzia* taxa, genus which has been proposed historically as complicated morphologically, counting with just a few DNA sequences for comparison. In relation with lifecycles, two lifecycles were elucidated: *N. melancorhypha* isolated from *C. melancoryphus* and *C. dombeyana*, and the other was from an undescribed taxon isolated from the same hosts mentioned above.

It is important to mention that in this doctoral thesis the characterization of nine taxa with the potential to represent new species for Schistosomatidae family was achieved, all which were isolated from the five anatid species sampled for this study. This remarkable record poses the need to continue the research about avian schistosomes, whose diversity is clearly underestimated.

According to the obtained results, both hypotheses were accepted. Besides, this study corresponds to the first morphological and molecular characterization of avian schistosomes present in Chile, giving additional evidence for this scarcely known group of parasites in South America, and contributing to the discussion about the specificity of these parasites to their avian hosts.

Keywords: Digenea, Schistosomatidae, Anseriformes, zoonotic disease, Neotropics.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	ix
1. ANTECEDENTES GENERALES.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	4
3. REFERENCIAS.....	6

CAPÍTULO I

HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS Y ETAPAS INTRAMOLUSCO DE ESQUISTOSOMAS AVIARES EN LAS ZONAS CENTRO Y SUR DE CHILE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
2.1. Hipótesis 1.....	13
2.2. Objetivos	13
2.2.1. Objetivo general	13
2.2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Materiales.....	14
3.1.1. Sitios de colecta de moluscos.....	14
3.1.2. Colecta de moluscos.....	14
3.2. Métodos	14
3.2.1. Hospederos.....	15
3.2.2. Esquistosomas aviares.....	15
3.2.3. Descriptores parasitológicos y análisis estadísticos.....	20
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Caracoles dulceacuícolas como hospederos intermediarios.....	25
4.2. Liberación, comportamiento cercarial y sobrevida.....	26
4.3. Descripción morfológica de los estadios intramolusco.....	28
4.4. Relaciones filogenéticas de las furcocercarias aisladas.....	42
4.5. Relación entre longitud de concha y parasitismo y especificidad.....	49

4.6. Ecosistema de los caracoles parasitados.....	50
5. DISCUSIÓN.....	52
6. REFERENCIAS.....	63

CAPÍTULO II

ESQUISTOSOMAS AVIARES EN AVES ANÁTIDAS DEL CENTRO Y SUR DE CHILE

1. INTRODUCCIÓN.....	71
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	74
2.1. Hipótesis 2.....	74
2.2. Objetivos	74
2.2.1. Objetivo general.....	74
2.2.2. Objetivos específicos.....	74
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
3.1. Materiales.....	75
3.1.1. Colecta de aves.....	75
3.2. Métodos	76
3.2.1. Hospederos.....	76
3.2.2. Esquistosomas aviares.....	76
3.2.3. Descriptores parasitológicos y análisis estadísticos.....	78
4. RESULTADOS.....	84
4.1. Aves anátidas como hospederos definitivos de esquistosomas.....	84
4.2. Descripción morfológica de los estadios adultos.....	86
4.2.1. <i>Trichobilharzia</i> Skrjabin y Zakharow, 1920.....	86
4.2.2. <i>Nasusbilharzia</i> Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021.....	111
4.2.3. <i>Dendritobilharzia</i> Skrjabin y Zakharow, 1920.....	117
4.3. Relaciones filogenéticas de los esquistosomas adultos aislados.....	136
4.4. Relaciones entre variables de las aves y los esquistosomas.....	146
4.5. Especificidad de esquistosomas adultos.....	147
5. DISCUSIÓN	149
6. REFERENCIAS	166

7. CONCLUSIONES.....173



ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO I

	PÁGINA
Figura 1. Mapa de las regiones consideradas en el presente estudio, especificando los sitios muestreados.	26
Figura 2. Esporoquistes en red penetrando la glándula digestiva del caracol <i>Chilina dombeyana</i> .	29
Figura 3. Furcocercaria Schistosomatidae. Se destaca con diferentes colores la organización de las glándulas de penetración.	31
Figura 4. Organización de las células flama en el cuerpo y tallo de la cola del Linaje I y linaje II.	32
Figura 5. Imágenes microscópicas de los linajes aislados y teñidos con Alum Carmín.	33
Figura 6. Imágenes MEB del tegumento del linaje I.	36
Figura 7. Imágenes MEB del tegumento del linaje II.	38
Figura 8. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen COI.	43
Figura 9. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen 28S.	44

Figura 10. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para los genes 28S-COI concatenados.

45



ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO II

	PÁGINA
Figura 1. Mapa de las regiones y localidades respectivas que formaron parte del presente estudio.	85
Figura 2. Macho de <i>Trichobilharzia</i> sp. 1 aislado desde el pato jergón chico (<i>Anas flavirostris</i>).	88
Figura 3. Fragmento del macho de <i>Trichobilharzia</i> sp. 2 aislado desde el pato jergón chico (<i>Anas flavirostris</i>).	90
Figura 4. Macho de <i>Trichobilharzia</i> sp. 2 aislado desde el pato jergón chico (<i>Anas flavirostris</i>).	91
Figura 5. Macho de <i>Trichobilharzia</i> sp. 3 aislado desde el pato jergón grande (<i>Anas georgica</i>).	93
Figura 6. Hembra de <i>Trichobilharzia</i> sp. 3 aislado desde el pato jergón grande (<i>Anas georgica</i>).	94
Figura 7. Macho de <i>Trichobilharzia</i> sp. 4 aislado desde el pato real (<i>Mareca sibilatrix</i>).	97
Figura 8. Hembra de <i>Trichobilharzia</i> sp. 4 <i>in toto</i> aislado desde el pato real (<i>Mareca sibilatrix</i>).	98
Figura 9. Detalles hembra de <i>Trichobilharzia</i> sp. 4 aislado desde el pato real (<i>Mareca sibilatrix</i>).	99

Figura 10. Macho de *Trichobilharzia querquedulae* aislado desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). **101**

Figura 11. Detalles macho de *Trichobilharzia querquedulae* aislado desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). **102**

Figura 12. Imágenes MEB del trematodo *Trichobilharzia querquedulae*, donde se observan detalles del tegumento en diferentes secciones de los vermes. **113**

Figura 13. Imágenes MEB del trematodo *Trichobilharzia querquedulae*, donde se observan detalles de las ventosas de los vermes. **114**

Figura 14. Macho de *Nasusbilharzia melancorhypha* aislado desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). **115**

Figura 15. Macho de *Nasusbilharzia melancorhypha* aislado desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). **116**

Figura 16. Macho de *Dendritobilharzia* sp. 1 aislado desde el pato jergón grande (*Anas georgica*). **119**

Figura 17. Aparato genital del macho de *Dendritobilharzia* sp. 1 aislado desde el pato jergón grande (*Anas georgica*). **120**

Figura 18. Tercio anterior del cuerpo de macho de *Dendritobilharzia* sp. 2 aislado desde el pato jergón chico (*Anas flavirostris*). **122**

Figura 19. Hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3 aislada desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). **129**

Figura 20. Hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3 aislada desde el pato real (*Mareca sibilatrix*). **130**

Figura 21. Parte del sistema reproductivo la hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3, aislada desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). **131**

Figura 22. Macho de *Dendritobilharzia* sp. 4 aislada desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). **134**

Figura 23. Hembra de *Dendritobilharzia* sp. 4 aislada desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). **135**

Figura 24. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen COI. **137**

Figura 25. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen 28S. **141**

Figura 26. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para los genes 28S-COI concatenados. **142**

ÍNDICE DE TABLAS CAPÍTULO I

PÁGINA

Tabla 1. Cebadores usados en el presente estudio, detallando los parámetros utilizados en el protocolo de PCR y el tamaño esperado de banda para el producto de PCR. **19**

Tabla 2. Secuencias obtenidas en GenBank. Solo se detalla la información de los esquistosomas aviares dentro o cercanamente relacionados con el clado DAS, mientras que el resto de los taxones forman parte del grupo externo (“outgroup”). **22**

Tabla 3. Localidades consideradas en el presente estudio, incluyendo el tamaño muestral por localidad para cada especie de caracol. **27**

Tabla 4. Medidas (en μm) de las furcocercarias registradas anteriormente en especies de *Chilina*, incluidos material del presente estudio. Adaptado de Flores *et al.* (2015). Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis. **40**

Tabla 5. Distancias genéticas para el gen COI entre los taxones del presente estudio y otros esquistosomas aviares depositados en el GenBank. **47**

Tabla 6. Distancias genéticas para el gen 28S entre los taxones del presente estudio y otros esquistosomas aviares depositados en el GenBank. **48**

Tabla 7. Análisis de Regresión logística simple considerando como variables la longitud de la concha de los caracoles y presencia de furcocercarias. **49**

Tabla 8. Análisis estadístico de Regresión binomial negativa simple considerando como variables la longitud de la concha y la abundancia de furcocercarias. **50**



ÍNDICE DE TABLAS CAPÍTULO II

PÁGINA

Tabla 1. Secuencias obtenidas en GenBank. Solo se detalla la información de los esquistosomas aviares dentro o cercanamente relacionados con el clado DAS, mientras que el resto de los taxa forman parte del grupo externo (“outgroup”). **80**

Tabla 2. Localidades desde donde se obtuvieron los anátidos que fueron parte del estudio. **86**

Tabla 3. Mediciones de los esquistosomas viscerales pertenecientes al género *Trichobilharzia* aislados en el presente estudio, incluyendo otras especies relacionadas. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis. **103**

Tabla 4. Mediciones obtenidas en cada uno de los esquistosomas nasales pertenecientes al género *Trichobilharzia*, incluyendo el aislado en el presente estudio. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis. **108**

Tabla 5. Mediciones de *Nasusbilharzia melancorhypha* aislados desde la mucosa nasal del cisne de cuello negro. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis. **117**

Tabla 6. Mediciones de los diferentes taxones de *Dendritobilharzia* aislados en el presente estudio, incluyendo otras especies relacionadas. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis. **123**

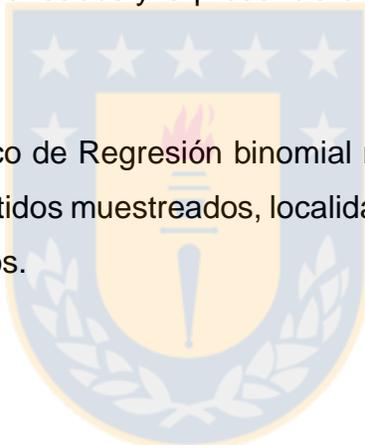
Tabla 7. Descriptores parasitológicos de cada uno de los taxones registrados en cada una de las especies de anátidos muestreados. **136**

Tabla 8. Distancias genéticas para le gen 28S entre los taxones aquí descritos y otros relacionados filogenéticamente. **144**

Tabla 9. Distancias genéticas para le gen COI entre los taxones aquí descritos y otros relacionados filogenéticamente. **145**

Tabla 10. Análisis de Regresión logística simple considerando como variables la especie de los anátidos muestreados y la presencia de esquistosomas adultos. **146**

Tabla 11. Análisis estadístico de Regresión binomial negativa considerando como variables especie de los anátidos muestreados, localidad de colecta y la abundancia de los esquistosomas adultos. **147**



ANTECEDENTES GENERALES

1. BREVE REVISIÓN ESQUISTOSOMAS AVIARES

Dentro de la subclase Digenea se encuentra la superfamilia Schistosomatoidea Stiles y Hassall, 1898, la cual se caracteriza por estar compuesta por trematodos cuyas cercarias tienen la habilidad de penetrar las superficies corporales de sus hospederos definitivos, para luego transformarse en una esquistosomula. Esta última tiene la capacidad de migrar en el torrente sanguíneo para finalmente alcanzar el estadio adulto, el cual habitará el sistema sanguíneo de dichos hospederos. Esta superfamilia está compuesta por 3 familias; Aporocotylidae Odhner, 1912, Spirorchiiidae Stunkard, 1921 y Schistosomatidae Stiles y Hassall, 1898 (Bray *et al.* 2008; Horák *et al.* 2014).

La familia Schistosomatidae está compuesta por 17 géneros cuyas especies parasitan el sistema circulatorio de aves y mamíferos. De estos, uno tiene como hospedero definitivo a humanos (*Schistosoma* Weinland, 1858), tres a otros mamíferos (*Bivitellobilharzia* Vogel y Minning, 1940, *Heterobilharzia* Price, 1929, *Schistosomatium* Tanabe, 1923) y 13 a especies aviares (Horák *et al.* 2014; Flores *et al.* 2021; Lorenti *et al.* 2022). Respecto a las especies que infectan al humano, las investigaciones se han centrado en tres especies del género *Schistosoma*, debido al perjuicio que representan para la salud humana; *Schistosoma mansoni* Sambo, 1907, *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) y *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) (Collins 2017).

Dentro del grupo a los esquistosomas aviares, el género *Trichobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920 es el más rico en especies con 40 especies descritas globalmente, parasitando mayoritariamente patos de diversos géneros (Brant y Loker 2009). Respecto con la descripción de esquistosomas aviares en anátidos Sudamericanos, se han indicado sólo seis especies, de las cuales en sólo cuatro se han dilucidado sus ciclos biológicos, tres en Brasil y uno en Argentina (ver Flores *et al.* 2015, 2021). Adicionalmente, en estos dos países se han encontrado cercarias de esquistosomas que no se han asignado a especies descritas, y por lo tanto podrían corresponder a nuevos taxones (e.g. Pinto *et al.* 2014, 2017; Flores *et al.* 2015).

En el último tiempo se ha planteado que ciertos esquistosomas aviares podrían manifestar especificidad hacia sus hospederos definitivos, con ejemplos como

Trichobilharzia querquedulae McLeod, 1937 parasitando sólo patos nadadores del clado aliazulados (“dabbling ducks”, género *Spatula* Boie, 1822, subfamilia Anatinae), *Trichobilharzia physellae* (Talbot, 1936) McMullen y Beaver, 1945 en patos buceadores (“diving ducks”, subfamilias Aythinae y Merginae), *Anserobilharzia brantae* Brant, Jouet, Ferte y Loker, 2013 en gansos, *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl y Skírnisson, 2006 y *Nasubilharzia melancorhypha* Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021 como parásito de cisnes (Kolářová *et al.* 2006; Brant 2007; Brant y Loker 2009; Flores *et al.* 2021). Esta especificidad podría deberse a diferencias filogenéticas o contraste ecológico entre las diferentes especies de anátidos (e.g. patos buceadores vs nadadores) (Brant y Loker 2009). Por otro lado, al comparar los hospederos intermediarios entre los continentes, hay diferencias en la predominancia de las familias de moluscos que participan en los ciclos biológicos. Por ejemplo, en Europa los miembros de la familia Lymnaeidae son los principales hospederos intermediarios, mientras que en Norteamérica lo son caracoles de la familia Physidae y secundariamente Lymnaeidae (Brant y Loker 2009). Desafortunadamente, para el caso de Sudamérica dicha información es escasa con registros en miembros de las familias Cochliopidae, Ampullariidae, Lymnaeidae, Planorbidae y Physidae (Pinto *et al.* 2014, 2017; Flores *et al.* 2015). Sin embargo, la mayoría de los registros provienen de distintas especies de la familia Chiliniidae, los cuales constituirían hospederos intermediarios importantes de esquistosomas aviares en el Cono Sur (Flores *et al.* 2015).

Por otro lado, estos parásitos son responsables del cuadro cutáneo zoonótico conocido como “dermatitis cercarial” que ocurre tras el contacto de personas con las cercarias presentes en los cuerpos de agua (Horák *et al.* 2012). Si bien en Europa se han registrado zonas de endemia para esta afección y en otras se creía ausente, recientemente se han registrado varios brotes en dicho continente, probablemente asociados a factores antrópicos como climáticos, y en consecuencia han sido catalogados como una enfermedad re-emergente (Kolářová *et al.* 2013; Horák *et al.* 2015). En Sudamérica existen escasos registros de dicha afección en personas, siendo diagnosticados principalmente en Argentina y Brasil (Flores *et al.* 2015), además de un registro durante el verano del año 2006 en la Laguna Chica de San Pedro, zona Centro-Sur de Chile, por Valdovinos y Balboa (2008).

En el caso de Chile, los dos registros de esquistosomas en aves nativas no lograron una identificación específica de los vermes, ya que sólo se registraron tras un examen

histopatológico (Paré y Black 1999; Oyarzún-Ruiz *et al.* 2019). Además, el único registro que indicó un género de esquistosoma aviar en caracoles dulceacuícolas (Valdovinos y Balboa 2008) fue recientemente cuestionado desde el punto de vista de su identificación (Pinto *et al.* 2014). Esta situación revela la importancia de identificar dichos parásitos y establecer qué organismos vertebrados como invertebrados participan en sus ciclos biológicos. Es así como la clasificación sistemática de estos digeneos requiere de una combinación de técnicas morfológicas y moleculares, lo que resultará en un mejor entendimiento de este grupo de trematodos subestimados en la región Neotropical (Horák *et al.* 2002; PAHO 2003; Flores *et al.* 2015, 2021).

Queda pendiente identificar las especies de trematodos Schistosomatidae con potencial zoonótico en la zona Centro y Sur de Chile, como también describir sus ciclos biológicos, ya que su conocimiento posee implicancias desde el punto de vista de la biodiversidad parasitaria, medicina veterinaria y en la salud pública. Con respecto a lo primero, el conocimiento de este grupo de parásitos es limitado en el continente Sudamericano y casi nulo en nuestro país (Pinto *et al.* 2014, 2017; Flores *et al.* 2015, 2021; Horák *et al.* 2015; Ebbs *et al.* 2016), por lo que identificar los taxones involucrados en este tipo de parasitismo será una contribución para entender su rango de hospederos e incluso la posibilidad de identificar nuevas especies (Gómez y Nichols 2013). En relación con el segundo punto, algunas especies de este grupo de parásitos puede causar enfermedades neurológicas serias en aves silvestres, tal como se ha reportado en Anseriformes (Horák *et al.* 2002, 2015), por lo que identificar estos helmintos es de relevancia para ser incluidos en los diagnósticos diferenciales de estas aves, las cuales además de ser las menos estudiadas de Sudamérica, están en su mayoría con problemas de conservación (Agüero *et al.* 2016; SAG 2017). De la misma forma, es importante para la clínica de pequeñas especies, donde se han reportado casos de dermatitis cercarial en perros. Si bien no se ha establecido en detalle si todas las especies de esquistosomas aviares son capaces de parasitar accidentalmente a los mamíferos, se plantea que grande parte de estas tendrían el potencial de hacerlo (Horák *et al.* 2015). Por otro lado, no se debe ignorar que factores como el cambio climático, urbanización y presiones antropogénicas sobre sitios naturales como la eutrofización, podrían aumentar las probabilidades de adquisición de dermatitis cercarial, como consecuencia de un ambiente más rico para la reproducción y sobrevida de los moluscos (Soldánová *et al.* 2013; Horák *et*

al. 2015). Por lo recién expuesto, la identificación de los sitios con los mencionados helmintos es valiosa, ya que puede sentar las bases de futuras campañas preventivas y así alertar al público que decida visitar dichos lugares, ya que los brotes en seres humanos, especialmente niños, puede provocar cuadros inflamatorios severos, además de poder repercutir en la actividad turística (PAHO 2003; Hórak *et al.* 2015; Marszewska *et al.* 2016).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A continuación, se detalla la organización de las hipótesis y objetivos específicos para cada uno de los capítulos: “hipótesis 1” y objetivos específicos “i, iii, iv, vi y viii” serán parte del capítulo I. Mientras que la “hipótesis 2” y los objetivos específicos “ii, iii, v, vii y ix” serán parte del capítulo II de la presente tesis doctoral.

2.1. Hipótesis

a. Hipótesis 1:

"Si la mayoría de los registros de esquistosomas aviáres en Sudamérica provienen de la familia Chiliniidae, entonces los hospederos intermediarios de estos trematodos en los sitios a muestrear en las zonas centro y sur de Chile corresponden a representantes de dicha familia".

b. Hipótesis 2:

“Teniendo en consideración la especificidad de los esquistosomas aviáres entre diferentes especies de anátidos, las comunidades de esquistosomas de patos y cisnes de cuello negro son distintas”.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Describir las diferentes poblaciones de esquistosomas aviáres en moluscos gasterópodos dulceacuícolas y aves anátidas colectados en diversas áreas de las zonas Centro y Sur de Chile, estableciendo los hospederos que participan en el ciclo biológico de cada especie de esquistosoma aviar identificado.

2.2.2. Objetivos específicos

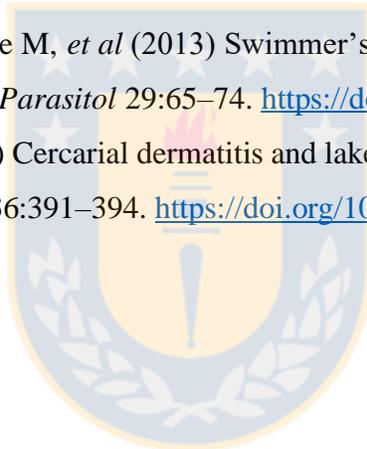
- i. Identificar y caracterizar morfológica como molecularmente las cercarias y esporoquistes de trematodos Schistosomatidae aislados desde cada una de las especies de moluscos dulceacuícolas.
- ii. Identificar y caracterizar morfológica y molecularmente los trematodos Schistosomatidae aislados desde cada una de las especies anátidas.
- iii. Determinar los hospederos definitivos e intermediarios que participan en los ciclos biológicos de cada especie de esquistosoma aviar identificado.
- iv. Estimar los descriptores parasitológicos de prevalencia, intensidad media y abundancia media de cercarias, además de la prevalencia de esporoquistes de cada especie de trematodo Schistosomatidae aislado para cada especie de molusco muestreado.
- v. Estimar los descriptores parasitológicos de prevalencia, intensidad media y abundancia media para cada especie de trematodo Schistosomatidae aislado desde cada especie aviar colectada.
- vi. Analizar si hay una asociación entre los descriptores parasitológicos de prevalencia y abundancia de los trematodos Schistosomatidae respecto a los factores de tamaño y especie de los moluscos muestreados.
- vii. Analizar si hay una asociación entre los descriptores parasitológicos de prevalencia y abundancia de los trematodos Schistosomatidae respecto a los factores de especie, edad y sexo de los anátidos muestreados.
- viii. Determinar el grado de especificidad de cada una de las especies de esquistosomas aviares respecto de las especies de caracoles dulceacuícolas muestreados.
- ix. Determinar el grado de especificidad de cada una de las especies de esquistosomas aviares respecto de las especies de anátidos muestreados.

3. REFERENCIAS

- Agüero ML, Gilardoni C, Cremonte F, Diaz JI (2016) Stomach nematodes of three sympatric species of anatid birds off the coast of Patagonia. *J Helminthol* 90:663–667. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000899>
- Brant SV (2007) The occurrence of the avian schistosome *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl et Skírnisson, 2006 (Schistosomatidae) in the tundra swan, *Cygnus columbianus* (Anatidae), from North America. *Folia Parasitol* 54:99–104. <https://doi.org/10.14411/fp.2007.013>
- Brant SV, Loker ES (2009) Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *J Parasitol* 95:941–963. <https://doi.org/10.1645/GE-1870.1>
- Bray RA, Gibson DI, Jones A (2008) *Keys to the Trematoda, Volume 3*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London, UK.
- Collins JJ (2017) Platyhelminthes. *Curr Biol* 27:252–256. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016>
- Ebbs ET, Loker ES, Davis NE, et al (2016) Schistosomes with wings: how host phylogeny and ecology shape the global distribution of *Trichobilharzia querquedulae* (Schistosomatidae). *Int J Parasitol* 46:669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.04.009>
- Flores V, Brant SV, Loker ES (2015) Avian schistosomes from the South American endemic gastropod genus *Chilina* (Pulmonata: Chiliniidae), with a brief review of South American schistosome species. *J Parasitol* 101:565–576. <https://doi.org/10.1645/14-639>
- Flores V, Viozzi G, Casalins L, et al (2021) A new Schistosome (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal tissue of South America black-necked swans, *Cygnus melancoryphus* (Anatidae) and the endemic pulmonate snail *Chilina gibbosa*. *Zootaxa* 4948:404–418. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4948.3.5>
- Gómez A, Nichols E (2013) Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2:222–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.07.002>

- Horák P, Kolářová L, Adema CM (2002) Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Adv Parasitol* 52:155–233. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(02\)52012-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(02)52012-1)
- Horák P, Schets FM, Kolářová L, Brant SV (2012) *Trichobilharzia*. In: Liu D (ed) *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. Taylor and Francis, CRC Press, Boca Raton, USA, pp 455–465.
- Horák P, Kolářová L, Mikeš L (2014) Chapter 10: Schistosomatoidea and Diplostomoidea. In: Toledo R, Fried B (eds) *Digenetic Trematodes*. Springer Science+Business Media, New York, pp 331–364.
- Horák P, Mikeš L, Lichtenbergová L, et al (2015) Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clin Microbiol Rev* 28:165–190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-14>
- Kolářová L, Rudolfová J, Hampl V, Skírnisson K (2006) *Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae). *Parasitol Int* 55:179–186. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.009>
- Kolářová L, Horák P, Skírnisson K, et al (2013) Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 45:63–74. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8334-y>
- Lorenti E, Brant SV, Gilardoni C, et al (2022) Two new genera and species of avian schistosomes from Argentina with proposed recommendations and discussion of the polyphyletic genus *Gigantobilharzia* (Trematoda, Schistosomatidae). *Parasitology*. Aceptado. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000130>
- Marszewska A, Cichy A, Heese T, Żbikowska E (2016) The real threat of swimmers' itch in anthropogenic recreational water body of the Polish Lowland. *Parasitol Res* 115:3049–3056. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5060-z>
- Oyarzún-Ruiz P, Muñoz P, Paredes E, et al (2019) Gastrointestinal helminths and related histopathological lesions in black-necked swans *Cygnus melancoryphus* from the Carlos Anwandter Nature Sanctuary, Southern Chile. *Rev Bras Parasitol Vet* 28:613–624. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019063>
- PAHO (2003) Trematodiasis: Cercarial dermatitis. In: *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals, Volume III Parasitoses*, Third edit. World Health Organization (WHO), Washington D. C., USA, pp 99–103.

- Paré JA, Black SR (1999) Schistosomiasis in a Collection of Captive Chilean Flamingos (*Phoenicopterus chilensis*). *J Avian Med Surg* 13:187–191.
- Pinto HA, Brant SV, Melo AL de (2014) *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as a natural intermediate host of *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae), a potential causative agent of avian cercarial dermatitis in Brazil. *Acta Trop* 138:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.002>
- Pinto HA, Pulido-Murillo EA, de Melo AL, Brant SV (2017) Putative new genera and species of avian schistosomes potentially involved in human cercarial dermatitis in the Americas, Europe and Africa. *Acta Trop* 176:415–420. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.016>
- SAG (2017) *Ley N°19.473 y su Reglamento*. Servicio Agrícola y Ganadero, Gobierno de Chile.
- Soldánová M, Selbach C, Kalbe M, *et al* (2013) Swimmer’s itch: Etiology, impact, and risk factors in Europe. *Trends Parasitol* 29:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.002>
- Valdovinos C, Balboa C (2008) Cercarial dermatitis and lake eutrophication in south-central Chile. *Epidemiol Infect* 136:391–394. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008734>



CAPÍTULO I

HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS Y ETAPAS INTRAMOLUSCO DE ESQUISTOSOMAS AVIARES EN LAS ZONAS CENTRO Y SUR DE CHILE

1. INTRODUCCIÓN

Los esquistosomas aviares son trematodos parásitos que habitan el torrente sanguíneo de aves dulceacuícolas como marinas de diversos órdenes. Este grupo está compuesto por 13 géneros descritos, aunque el género *Trichobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920 es considerado el más rico en especies con 40 taxones descritos (Dvořák *et al.* 2002; Brant y Loker 2009a; Horák *et al.* 2015; Flores *et al.* 2021; Lorenti *et al.* 2022). Sus ciclos biológicos involucran a las aves acuáticas como hospederos definitivos, donde los vermes adultos copulan y liberan sus huevos a través del material fecal (esquistosomas viscerales), o de las secreciones nasales (esquistosomas nasales) (Soldánová *et al.* 2013; Horák *et al.* 2015). Luego los miracidios eclosionan desde los huevos y buscan a su hospedero intermediario específico, un caracol acuático. Dentro del gasterópodo, el miracidio se transforma a un esporoquiste madre, los cuales están íntimamente asociados al hepatopáncreas del gasterópodo y van a originar esporoquistes hijos. Luego de varias semanas, entre 3-10 semanas dependiendo de la especie, estos esporoquistes hijos comienzan a producir las furcocercarias, las cuales son liberadas a la columna de agua para iniciar la búsqueda de su hospedero definitivo y reiniciar el ciclo biológico (Horák y Kolářová 2011; Horák *et al.* 2015).

Estas cercarias son capaces de penetrar la piel de humanos u otros mamíferos. Esta situación ocurre debido a la presencia de ácidos grasos en la piel, los cuales son compartidos con las aves acuáticas, induciendo a la penetración cutánea accidental de estos parásitos, causando la zoonosis llamada “sarpullido del nadador” o dermatitis cercarial (DC) (Horák y Kolářová 2001; Soldánová *et al.* 2013; Horák *et al.* 2015). Esta afección ocurre cuando los humanos toman contacto con cuerpos de agua repletos de estos estadios larvales, debido a la presencia de los hospederos intermediarios. Sin embargo, en el primer contacto podría haber una reacción cutánea leve o ausencia total de cualquier reacción, aunque la esquistosomula,

etapa posterior a la furcocercaria, podría alcanzar otros órganos luego de viajar a través del torrente sanguíneo (Horák y Kolářová 2001, 2011; Kolářová *et al.* 2013). Cuando los humanos se han expuesto de forma repetida a estas cercarias, la sensibilización toma lugar causando una reacción cutánea que es caracterizada por erupciones maculares, eritema y urticaria acompañada por un intenso prurito, el cual podría culminar con pústulas debido a la contaminación bacteriana. Esta presentación clínica puede durar de horas hasta semanas, dependiendo el nivel de sensibilidad de los individuos afectados (Horák y Kolářová 2001; Soldánová *et al.* 2013; Horák *et al.* 2015; Marszewska *et al.* 2016). Además, se plantea que grupos etarios vulnerables como niños o ancianos parecen desarrollar una enfermedad más complicada con manifestación de una fiebre severa (Marszewska *et al.* 2016). Adicionalmente, algunos autores, basados en experimentos en modelos murinos, sugieren que las cercarias pueden diferenciarse a esquistosomula en la piel humana, migrando a diferentes órganos como el hígado, pulmones, incluso el sistema nervioso central causando un cuadro mucho más complicado (Horák y Kolářová 2001; Kolářová *et al.* 2001).

La ocurrencia de dermatitis cercarial ha sido bien documentada en el hemisferio Norte donde es considerada una parasitosis endémica (Horák *et al.* 2015; Marszewska *et al.* 2016). No obstante, su denuncia es esporádica debido a que es confundida habitualmente con otras afecciones cutáneas, y en consecuencia es subdiagnosticada (Marszewska *et al.* 2016). El número de personas afectadas en estos brotes es variable, con algunos casos aislados en bañistas como en investigadores realizando estudios malacológicos en cuerpos de agua superficiales como lagunas (Cort 1936, Cort *et al.* 1940), brotes de más de 10 personas en República Checa (Macháček *et al.* 2018) y Polonia (Marszewska *et al.* 2016), 40 personas en Canadá (Brant *et al.* 2010), y sobre 300 casos en el curso de un verano en Estados Unidos (Lindblade 1998). Incluso, se han llegado a establecer niveles elevados de su ocurrencia en trabajadores de arrozales de Irán, con casi el 70% de ellos evidenciando lesiones cutáneas típicas de DC de un total de 951 personas (Lashaki *et al.* 2021). Recientemente, la dermatitis cercarial se ha reportado como una enfermedad emergente, tanto por los recientes brotes en áreas donde la parasitosis era desconocida como por el incremento en el número de brotes asociado al cambio climático en países con ocurrencia de esta parasitosis de larga data (Horák y Kolářová 2011; Horák *et al.* 2015).

Hay una notoria correlación entre la familia de hospederos intermediarios y el continente donde estos esquistosomas están distribuidos. Por ejemplo, en Europa la mayoría de los caracoles que actúan como hospederos de esquistosomas aviáres son taxones de la familia Lymnaeidae, en Norteamérica es la familia Physidae seguido de Lymnaeidae (Brant *et al.* 2006; Brant y Loker 2009a, b; Soldánová *et al.* 2013; Horák *et al.* 2015). Sin embargo, para Sudamérica hay varios taxones albergando larvas de esquistosomas aviáres como las familias Ampullariidae, Planorbidae, Physidae, Lymnaeidae, Cochliopidae, aunque las especies de la familia Chilinae son los hospederos de esquistosomas aviáres más frecuentemente mencionados (ver Flores *et al.* 2015). No obstante, en Sudamérica hay una notoria concentración de la información sobre esquistosomas aviáres, incluyendo la descripción de los vermes como de los casos humanos, en Brasil y Argentina (Flores *et al.* 2015, 2021; Pinto *et al.* 2014, 2017; Ebbs *et al.* 2016), mientras que en el resto de los países sudamericanos hay una ausencia total de información (Flores *et al.* 2015, 2021) o contados reportes como por ejemplo en Chile (Paré y Black 1999; Valdovinos y Balboa 2008; Oyarzún-Ruiz *et al.* 2019).

La sistemática de los esquistosomas neotropicales, tanto de los esquistosomas marinos como dulceacuícolas, es pobremente entendida (Pinto *et al.* 2014, 2017; Flores *et al.* 2015, 2021; Ebbs *et al.* 2016; Brant *et al.* 2017). Hasta ahora, siete géneros y 11 especies se han registrado en el Neotrópico, aunque la mayoría de estos corresponden a registros antiguos sin datos moleculares (Pinto *et al.* 2014; Flores *et al.* 2015, 2021; Ebbs *et al.* 2016; Lorenti *et al.* 2022). Además, hay aproximadamente 10 diferentes furcocercarias cuya identidad específica permanece desconocida (ver Szidat 1951, 1958; Martorelli 1984; Flores *et al.* 2015). La caracterización molecular es particularmente relevante para la identificación de los estadios larvales reportados desde hospederos moluscos, los cuales son difíciles de clasificar al nivel de especie debido a la morfología y morfometría similar entre distintos taxones, permitiendo así su comparación con secuencias disponibles de potenciales hospederos definitivos, contribuyendo al esclarecimiento de sus ciclos biológicos (Brant *et al.* 2006; Brant y Loker 2009a, b; Horák *et al.* 2012, 2015).

En Chile, hay limitada información en relación con los esquistosomas aviáres con sólo dos registros previos en aves acuáticas, el primero en el flamenco chileno (*Phoenicopterus chilensis* Molina, 1782) en el Norte del país (Paré y Black 1999) y el más reciente registro en el cisne de cuello negro [*Cygnus melancoryphus* (Molina, 1782)] en el Sur de Chile

(Oyarzún-Ruiz *et al.* 2019). En ambos casos sólo se registraron los vermes y huevos en cortes histopatológicos. Respecto a la dermatitis cercarial en el país, existe un único registro de un brote en la Laguna Chica de San Pedro, región del Biobío, en el año 2006 (Valdovinos y Balboa 2008). El esquistosoma responsable se identificó como *Trichobilharzia* sp., sin embargo, considerando los rasgos morfológicos de estas furcocercarias como el hospedero intermediario involucrado, un caracol de la familia Chiliniidae, su identidad fue recientemente cuestionada (Pinto *et al.* 2014).

Chile posee una rica diversidad de moluscos dulceacuícolas, con 73 especies distribuidas en cinco familias. De estas, las familias Chiliniidae e Hydrobiidae albergan el mayor número de taxones con 30 y 22 especies, respectivamente (Valdovinos 2006; Fuentealba *et al.* 2010). Globalmente, caracoles de las familias Chiliniidae, Cochliopidae, Lymnaeidae y Physidae se han reportado como hospederos intermediarios en el ciclo biológico de los esquistosomas aviarios (Kolářová *et al.* 2010; Flores *et al.* 2015; Horák *et al.* 2015). Adicionalmente, estas cuatro familias poseen una amplia distribución en las zonas Centro y Sur de Chile, particularmente los miembros de la familia Chiliniidae (Valdovinos 2006; Fuentealba *et al.* 2010).

Aunque hay cierta información sobre la presencia de esquistosomas aviarios en el país, no hay información específica sobre su biología como la ecología, morfología, ciclos biológicos ni secuencias de ADN. Así, el propósito del presente estudio fue identificar por primera vez los hospederos, así como caracterizar la morfología e información genética de esquistosomas aviarios distribuidos en caracoles del centro y sur de Chile. Además, establecer un contexto para futuros estudios respecto a la biología y sistemática de estos trematodos desconocidos en el Neotrópico.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis 1

“Si la mayoría de los registros de esquistosomas aviares en Sudamérica provienen de la familia Chiliniidae, entonces los hospederos intermediarios de estos trematodos en los sitios a muestrear en las zonas centro y sur de Chile corresponden a representantes de dicha familia”.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Describir las diferentes poblaciones de esquistosomas aviares en moluscos gasterópodos dulceacuícolas colectados en diversas áreas de las zonas Centro y Sur de Chile.

2.2.2. Objetivos específicos

- i. Identificar y caracterizar morfológica- como molecularmente las cercarias y esporoquistes de trematodos Schistosomatidae aislados desde cada una de las especies de moluscos dulceacuícolas.
- ii. Determinar los hospederos intermediarios que participan en los ciclos biológicos de cada especie de esquistosoma aviar identificado.
- iii. Estimar los descriptores parasitológicos de prevalencia, intensidad media y abundancia media de cercarias, además de la prevalencia de esporoquistes de cada especie Schistosomatidae aislada para cada especie de molusco muestreado.
- iv. Analizar si hay asociación entre los descriptores parasitológicos de prevalencia y abundancia de los trematodos Schistosomatidae respecto a los factores de tamaño y especie de los moluscos muestreados.
- v. Determinar el grado de especificidad de cada una de las especies de esquistosomas aviares respecto de las especies de caracoles dulceacuícolas muestreados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Sitios de colecta de moluscos

Se realizó la colecta de moluscos en estanques, humedales, lagos, lagunas y zonas anegadas de las regiones del Ñuble (XVI), del Biobío (VIII) y de Los Ríos (XIV). Los sitios se caracterizaron por poseer abundante vegetación acuática con aguas tranquilas, lo que favorece la presencia de caracoles (Szidat 1951, 1958; Ostrowski de Núñez 1992) como de aves anátidas, o al menos que fueran frecuentados por estas últimas. Todo lo anterior para otorgar las condiciones idóneas para que el ciclo biológico de los esquistosomas aviáres pueda completarse. Además, tras cada visita en los sitios donde se colectaron los moluscos se registraron las especies de aves acuáticas presentes en dichos sitios. Las regiones antes mencionadas fueron elegidas porque en la Laguna Chica de San Pedro (región del Biobío) se reportaron tanto los primeros casos de dermatitis cercarial como de furcocercarias (Valdovinos y Balboa 2008), además de un caso puntual en la Laguna Santa Elena (región del Ñuble) (*Dato no publicado*), y finalmente la región de Los Ríos porque fue allí donde se reportó por primera vez un anátido siendo parasitado por esquistosomas aviáres en Chile (Oyarzún-Ruiz *et al.* 2019) (Figura 1).

3.1.2. Colecta de moluscos

Para la colecta de los moluscos, ésta se realizó durante las estaciones de primavera y verano, ya que allí los caracoles presentan una mayor actividad, facilitando su colecta, y comienzan a liberar las cercarias (Kolářová *et al.* 2013). Respecto al tamaño muestral, éste fue de 2.284 caracoles dulceacuícolas en total, tamaño basado en estudios previos (Ostrowski de Núñez 1978, 1992; Kolářová *et al.* 2010, 2013; Horák *et al.* 2012, 2015).

Los caracoles fueron colectados a mano desde plantas acuáticas, rocas y troncos flotando o sumergidos, como también mediante el uso de un colador con mango metálico de poco más de 1 metro de largo que permitió colectar aquellos especímenes que se encontraban a mayor profundidad. La profundidad máxima de colecta de caracoles fue de 1.5 metros (Flores *et al.* 2015).

3.2. Métodos

3.2.1. Hospederos

a. Identificación de caracoles dulceacuícolas

i. *Identificación morfológica*

Mediante el uso de un pie de metro se registró en mm la longitud de las conchas, considerando el borde anterior hasta el ápex de ésta. Además, se determinó el lado en que se dirigía la apertura de la concha como la coloración y diseños en la misma. Todas estas características fueron inicialmente comparadas con las claves dicotómicas de Biese (1949, 1951), para que luego un malacólogo experto en caracoles dulceacuícolas, Dr. Gonzalo Collado de la Universidad del Biobío, confirmara la identificación.

3.2.2. Esquistosomas aviares

a. Identificación estadios larvarios

i. *Emergencia cercarial y prospección estadios intramolusco*

Los caracoles fueron dispuestos de forma individual en placas de cultivo celular de 12 pocillos bajo luz artificial durante 12 horas/día por 3 días consecutivos para estimular la liberación de cercarias. Cada caracol fue diariamente revisado bajo lupa estereoscópica temprano en la mañana (8 am), al mediodía, y en la tarde (6 pm). Las cercarias tipo furcocercarias fueron colectadas con una pipeta de vidrio, disponiéndose sobre un portaobjetos para ser teñidas con tinción Rojo Neutral (Santacruz) mientras fueron observadas bajo microscopía de luz (Ostrowski de Núñez 1978, 1992). Las furcocercarias que emergieron fueron observadas igualmente bajo estereomicroscopio para establecer su comportamiento natatorio. Así mismo, las respuestas conductuales a estímulos luminosos y mecánicos (movimiento del agua con ayuda de un asa metálica) fueron evaluados. Además, otros especímenes se preservaron en etanol absoluto (100%) para los análisis moleculares, y etanol 80% para la realización de microscopía electrónica de barrido (Kolářová *et al.* 2010; Horák *et al.* 2012; Christiansen *et al.* 2016; Marszewska *et al.* 2016).

Al tercer día los caracoles fueron diseccionados bajo lupa estereoscópica, haya ocurrido o no liberación cercarial, para determinar la presencia de estadios intramolusco, i.e. esporoquistes, además de cercarias que se encontraran en desarrollo. Así mismo, los caracoles que murieron antes del 3° día fueron inmediatamente diseccionados. Se debe tener en consideración que la prevalencia estimada sólo en base a la liberación cercarial podría

subestimar el valor real de dicho descriptor parasitológico, por lo que la determinación de estos estadios intramolusco es importante (Horák *et al.* 2012, 2015). Los esporoquistes y/o furcocercarias colectados durante la disección fueron depositados en etanol absoluto para los análisis moleculares.

ii. *Identificación morfológica*

En cuanto a la morfología interna, las cercarias vivas fueron teñidas con tinción Rojo Neutral (Neutral Red Solution, SANTACRUZ) mientras eran observadas bajo microscopía de luz, permitiendo determinar el número y patrón de las glándulas de penetración como también del sistema excretor en la superficie de su cuerpo, lo cual es de utilidad en la identificación de estas (Ostrowski de Núñez 1978, 1992). Para realizar las mediciones y cálculo de proporciones de las diversas estructuras de las cercarias (cuerpo, tallo, furcas, órgano de penetración, ocelos, acetábulo, primordio genital), un segundo pool de cercarias no teñidas *in vivo* fueron muertas y fijadas en etanol 96% para luego ser preservadas en etanol 80%. Estas se tiñeron con Alum Carmín, pasando por concentraciones crecientes de etanol (70-100%), diafanizadas en aceite de clavo y finalmente montadas de forma permanente en Bálsamo de Canadá para su caracterización bajo microscopía de luz (Lutz *et al.* 2017). Las mediciones se realizaron con el software Motic Images Plus 2.0 asociado al microscopio óptico MOTIC BA310 usando los objetivos 10x y 40x.

Adicionalmente, se destinó un tercer pool de cercarias para la realización de Microscopía electrónica de barrido (MEB). Este procedimiento tiene la utilidad de caracterizar detalladamente la superficie de las cercarias para determinar la presencia y distribución de estructuras tales como papilas y espinas sobre el cuerpo, tallo y furcas, los cuales son de utilidad en la clasificación de estos parásitos (Kolářová *et al.* 2010). Para llevar a cabo dicha técnica, las cercarias fueron preservadas previamente en etanol 80%, para luego ser transferidas al líquido iónico por un máximo de 4 horas previo a la realización del MEB. Los vermes fueron depositados sobre una placa de fibra de carbono de 15 mm de diámetro (“stub”), la cual fue ingresada en el “cool stage” del equipo de microscopía electrónica de barrido HITACHI SU 3500 para ser congelada a -30°C y luego ser puesta al vacío. A continuación, y dependiendo de las características de los ejemplares, se estableció la

configuración del software (valores de spot, VP-SEM, Kv y Pa) para obtener las imágenes de los vermes.

La morfología interna y externa de las cercarias fueron comparadas con las claves dicotómicas de Szidat (1951, 1958), Ostrowski de Núñez (1978, 1992), Martorelli (1984, 1989), Schell (1985), Horák *et al.* (2002), Fernández *et al.* (2013) y Flores *et al.* (2015).

Mediante la disección de los caracoles se determinó la presencia de esporoquistes, los cuales se caracterizaron por ser largos y delgado, con células germinales o cercarias inmaduras en su interior (Ostrowski de Núñez 1978, 1992; Horák *et al.* 2002). Una vez colectados fueron preservados en etanol absoluto, ya que al no poseer una morfología típica que los distinga de otras familias de trematodos, e.g. Diplostomidae, se requiere de técnicas moleculares para confirmar su identificación (Horák *et al.* 2012, 2015).

iii. *Extracción de ADN y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Dentro del grupo de cercarias colectadas se destinó un pool para la realización de técnicas moleculares, debido a que la diferenciación entre especies de un mismo género es sumamente compleja. En el caso de los estadios esporoquiste, todos estos fueron destinados para la realización de técnicas de PCR. Los trematodos fueron preservados en etanol absoluto y a continuación almacenados a -18 °C (Kolářová *et al.* 2010; Horák *et al.* 2012; Christiansen *et al.* 2016). Se utilizó ADN genómico el cual fue extraído utilizando el kit DNeasy blood and animal tissue (QIAGEN, Alemania) para el caso de las cercarias colectadas tras su liberación. En el caso particular de los esporoquistes, y teniendo en cuenta que éstos están asociados profundamente al tejido de los caracoles, el ADN fue extraído mediante el kit E.Z.N.A. Mollusc DNA kit (Omega Bio-tek, Estados Unidos). Esta salvedad se debe a la presencia de mucopolisacáridos en el tejido de los moluscos, los cuales son inhibidores de la PCR. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad de ADN para cada muestra extraída se midió con un Espectrofotómetro Epoch™ Microplate. Las muestras con valores entre 1.6 y 2.0 para la proporción de absorbancia A260/A280 fueron consideradas puros y adecuados para la amplificación mediante PCR (Khare *et al.* 2014). Finalmente, el ADN se preservó a -24°C hasta la realización del análisis molecular.

Un PCR Touchdown fue llevado a cabo para amplificar las secuencias parciales de los genes citocromo oxidasa subunidad 1 (COI ADNmt) y 28S (ADNr) (Brant y Loker 2009a;

Pinto *et al.* 2014). Para COI una PCR semi-anidada fue realizada usando los cebadores Cox1_schist_5' y Cox1_schist_3', sin embargo, cuando la secuenciación falló debido a problemas en las secuencias obtenidas, los cebadores CO1F15, CO1R15 y el cebador de secuenciación interno CO1RH3R fueron usados. Para 28S, una PCR anidada fue llevada a cabo usando los cebadores U178, L1642, y los cebadores de secuenciación internos ECD2 y DIG12. Para detalles de las secuencias de cada cebador ver Tabla 1 (Tkach *et al.* 2000; Lockyer *et al.* 2003; Olson *et al.* 2003; Brant y Loker 2009a). Cada reacción se realizó acorde a lo sugerido por Dvořák *et al.* (2002) y Horák *et al.* (2012); se agregó 3 µL de ADN templado en un mix de 0,3 µL Polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific, USA), 0,5 µL dNTPs (0,2mM), 2,5 µL tampón DreamTaq, 1 µL de cada cebador (10 pmol) y 16,7 µL de agua ultra-pura para completar un volumen final de 25 µL.

El protocolo de amplificación varió acorde a cada gen. En el caso del gen COI fue: 15 ciclos de hibridación a 50°C, 49°C, 48°C, 47°C y 46°C con 3 ciclos cada uno durante 30 segundos. Luego 20 ciclos de hibridación a 45°C por 30 segundos. La extensión se realizó a 72°C y la desnaturalización a 95°C. Mientras tanto para el gen 28S el protocolo consideró: 15 ciclos de hibridación a 55°C, 54°C, 53°C, 52°C y 51°C con 3 ciclos cada uno por 30 segundos. Luego 20 ciclos de hibridación a 50°C por 30 segundos. La extensión se realizó a 72°C y la desnaturalización a 95°C. Los amplicones fueron dispuestos en electroforesis en geles de agarosa 2% con la tinción GelRed® (Biotum, USA), y visualizados en el transiluminador UV ENDURO™ GDS. Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones en Macrogen (Seúl, Corea del Sur; <https://dna.macrogen.com/>). En el caso de detectar dobles bandeos se solicitó a Macrogen la extracción en gel, con la posterior purificación y secuenciación.

iv. *Análisis filogenéticos*

Se verificó la calidad y se editaron las secuencias con el programa Geneious Prime® version (v) 2021.2.2 (<https://www.geneious.com>) con el fin de obtener las secuencias consenso. Además, para comparaciones, se llevaron a cabo búsquedas de alineamiento local básico con la herramienta BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), y secuencias similares se descargaron de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabla 2) para construir múltiples alineamientos en Geneious empleando el algoritmo MAFFT (Kato y

Standley 2013). Alternativamente se utilizó el software Mesquite para dicho alineamiento, para luego ser revisado en el programa MEGA7 (Kumar *et al.* 2016).

Tabla 1. Cebadores usados en el presente estudio, detallando los parámetros utilizados en el protocolo de PCR y el tamaño esperado de banda para el producto de PCR.

Gen	Cebador	Secuencia	T _o (C°)*	Longitud (pb)	Referencias
COI	Cox1_schist_5'	TCTTTRGATCATAAGCG	50-46 ciclo 1; 45 ciclo 2	1000	Lockyer <i>et al.</i> (2003)
	Cox1_schist_3'	TAATGCATMGGAACAAAAACA			
COI	COIF15	TTTNTYTCTTTRGATCATAAGC	50-46 ciclo 1; 45 ciclo 2	600	Brant y Loker (2009a)
	COIR15	TGAGCWAYHACAAAYCAHGTATC			
	COIRH3R interno	TAAACCTCAGGATGCCCAAAAAA			
28S	U178	GCACCCGCTGAAYTTAAG	55-51 ciclo 1; 50 ciclo 2	1500	Tkach <i>et al.</i> (2000), Lockyer <i>et al.</i> (2003), Olson <i>et al.</i> (2003)
	L1642	CCAGCGCCATCCATTTTCA			
	DIG12 interno	AAGCATATCACTAAGCGG			
	ECD2 interno	CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG			

*Temperatura observable

Para ambos genes, las reconstrucciones filogenéticas se realizaron mediante los métodos de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) con los programas IQ-Tree v1.6.12 (Nguyen *et al.* 2015) y MrBayes v3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012), respectivamente. Los mejores modelos de sustitución nucleotídica para los análisis de MV fueron seleccionados usando los comandos del algoritmo ModelFinder “-m MFP+MERGE” para COI y “-m MFP” para 28S (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017). Finalmente, para evaluar la robustez del árbol filogenético inferido con 1.000 pseudo-réplicas de bootstrapping ultrarápido, se emplearon los métodos de perturbación estocásticos y “rapid-hill-climbing” con IQ-TREE. Bootstrap ultrarápido con valores inferiores a 70 se consideraron como soporte bajo (no-significativos), entre 70 y 94 como soporte moderado, y sobre 95 como un soporte estadístico robusto (Minh *et al.* 2013).

En el análisis de IB se usaron los siguientes comandos de MrBayes para seleccionar los mejores modelos evolutivos: para el set de datos de COI que fue particionado en tres particiones (codon1, codon2 y codon3) el comando “nst=mixed rates=invgamma ngammacat=4”, y para el set de datos de 28S el comando "nst=mixed rates=gamma ngammacat=4" (Huelsenbeck *et al.* 2004; Ronquist *et al.* 2012). Todos los parámetros fueron

desligados (“unlinked”) entre las particiones. Dos pruebas independientes de 5×10^6 generaciones y cuatro cadenas MCMC se corrieron simultáneamente, muestreando árboles cada 1.000 generaciones, y removiendo los primeros 25% como quemados (“burn-in”). Las probabilidades bayesianas posteriores (BPP) con valores ≥ 0.70 se consideraron como un fuerte soporte estadístico (Huelsenbeck y Rannala 2004).

Por otro lado, las secuencias analizadas para ambos genes a través de MV e IB fueron concatenados. Estos sets de datos de secuencias concatenadas fueron creados con el programa Mesquite v3.70 (Maddison y Maddison 2021). En el caso de IB, cuatro particiones se establecieron: uno para 28S (nst=mixed rates=gamma ngammacat=4) y tres para COI; codon1, codon2 y codon3 (nst=mixed rates=invgamma ngammacat=4). Todos los parámetros entre las particiones fueron desligados (“unlinked”). Para este set de datos, dos pruebas independientes de 8×10^6 generaciones y cuatro cadenas MCMC se corrieron simultáneamente, con un muestreo de árboles cada 1.000 generaciones y removiendo los primeros 25% como quemados (“burn-in”). En todos los casos, se empleó el programa Tracer v1.7.1. para confirmar la correlación y tamaño de muestreo efectivo (ESS) de las cadenas de Markov (Rambaut *et al.* 2018).

Las distancias genéticas entre los linajes aislados en el presente estudio y aquellos utilizados en los análisis filogenéticos se estimaron usando el programa MEGA7 (Kumar *et al.* 2016).

3.2.3. Descriptores parasitológicos y Análisis estadísticos

Los descriptores parasitológicos de prevalencia (P), intensidad de infección (I), intensidad media (I_M) y abundancia media (A_M) de cercarias, además de la prevalencia (P) de esporoquistes fueron calculados e interpretados acorde a Bush *et al.* (1997).

La asociación entre la longitud de la concha y la presencia/ausencia de furcocercarias se analizó mediante Regresión logística simple. La asociación entre la longitud de la concha (en mm) y la cantidad de furcocercarias (abundancia) se analizó mediante una Regresión binomial negativa simple. Los análisis mencionados se realizaron con el software Stata/BE 17 Stata Corp LLC.

Se evaluó la especificidad de cada especie de esquistosoma aviar respecto a las distintas especies de moluscos, mediante el índice de Especificidad de Poulin y Moulliot

(S_{TD}) (Poulin 2007) que permite una comparación entre diferentes taxones de parásitos utilizando una gama de diferentes especies hospederas. Este índice mide la distinción taxonómica (número de “pasos” desde género a Phylum) promedio de todas las posibles parejas de especies hospederas usadas por una especie parásita. El valor del índice es inversamente proporcional a la especificidad; un alto valor del índice significa que en promedio los hospederos de una especie de parásito no están cercanamente relacionado. Al comparar los valores del S_{TD} entre diferentes parásitos, aquel con el menor valor indicará un mayor nivel de especificidad, caso opuesto si el valor es mayor. El valor de $S_{TD}=1$ sugiere un parásito altamente específico (Poulin 2007).



Tabla 2. Secuencias obtenidas en GenBank. Solo se detalla la información de los esquistosomas aviares dentro o cercanamente relacionados con el clado DAS, mientras que el resto de los taxones forman parte del grupo externo (“outgroup”).

Taxón	Hospedador	Localidad	Código de acceso Genbank	
			28S	COI
Schistosomatidae sp. MSB Para 7973 Lineage 3	<i>Chilina dombeyana</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Mascardi, Argentina	KC113055	KC113073
Schistosomatidae sp. MSB Para 7977 Lineage 3	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago La Patagua, Argentina	KC113059	KC113075
Schistosomatidae sp. MSB Para 7970 Lineage 3	<i>Chilina neuquenensis</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Correntoso, Argentina	KC113053	-
Schistosomatidae sp. MSB Para 7959 Lineage 2	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Reserva Pellegrini, Argentina	KC113065	KC113078
Schistosomatidae sp. MSB Para 7969 Lineage 2	<i>Chilina perrieri</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Musters, Argentina	KC113071	KC113086
<i>Nasubilharzia melancorhypha</i>	<i>Cygnus melancoryphus</i> (Aves, Anatidae)	Lago Mari Menuco, Lago Pellegrini, Argentina	MW000331	MW012493
Schistosomatidae sp. MSB Para 7954 Lineage 1	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Reserva Pellegrini, Argentina	KC113051	KC113072
Schistosomatidae sp. MSB Para 7952 Lineage 1	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Nahuel Huapi, Argentina	KC113049	-
Schistosomatidae sp. ex <i>Melanoides tuberculata</i>	<i>Melanoides tuberculata</i> (Gastropoda, Thiaridae)	Emiratos Árabes Unidos	JX875068	JX875069
Schistosomatidae sp. CRAM2127	<i>Spheniscus magellanicus</i> (Aves, Spheniscidae)	Rio Grande, Brasil	MG670449	MG707172
Schistosomatidae sp. ex penguin JA 2014	<i>Spheniscus demersus</i> (Aves, Spheniscidae)	Sudáfrica	KM023789	-
Schistosomatidae sp. W829	<i>Larus dominicanus</i> (Aves, Laridae)	Argentina	KX302891	KX302898
Schistosomatidae sp. W636	<i>Siphonaria lessonii</i> (Gastropoda, Siphonariidae)	Argentina	KX302889	-
Schistosomatidae sp. W640	<i>Siphonaria lessonii</i> (Gastropoda, Siphonariidae)	Argentina	-	KX302897
Schistosomatidae sp. W217	<i>Haminoea japonica</i> (Gastropoda, Haminoeidae)	EUA	-	KX302895
Avian schistosomatid sp. W327 <i>Haminoea</i> CA	<i>Haminoea japonica</i> (Gastropoda, Haminoeidae)	EUA	GQ920620	-
<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	<i>Gallus gallus</i> (Aves, Phasianidae)	EUA	AY157241	AY157187
<i>Dendritobilharzia</i> sp. W499	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	EUA	-	KX302892
Schistosomatidae sp. 2 W402	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	EUA	MF598180	MF598175
Schistosomatidae sp. 2 W165	<i>Aix sponsa</i> (Aves, Anatidae)	EUA	-	MF598174
Schistosomatidae sp. 2 W480	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	EUA	MF598182	MF598176

Schistosomatidae sp. 1 W847	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Brasil	-	MF598177
Schistosomatidae sp. 1 W848	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Brasil	MF598183	MF598178
<i>Gigantobilharzia huronensis</i>	<i>Agelaius phoeniceus</i> (Aves, Icteridae)	EUA	AY157242	AY157188
Avian schistosomatid sp. W2081	<i>Ceratophallus natalensis</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Kenia	AY858887	AY829247
<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	<i>Spatula cyanoptera</i> (Aves, Anatidae)	EUA	FJ174470	-
<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	<i>Spatula versicolor</i> (Aves, Anatidae)	Argentina	-	KU057184
<i>Trichobilharzia</i> sp. A SVB 2009 W149	<i>Mareca americana</i> (Aves, Anatidae)	EUA	FJ174472	FJ174524
<i>Trichobilharzia</i> sp. B SVB 2009	<i>Mareca americana</i> (Aves, Anatidae)	EUA	-	FJ174528
<i>Trichobilharzia physellae</i>	<i>Bucephala albeola</i> (Aves, Anatidae)	EUA	FJ174474	-
<i>Trichobilharzia physellae</i>	"Mallard" (Aves, Anatidae)	EUA	-	MK433251
<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix</i> sp. (Gastropoda, Lymnaeidae)	Alemania	FJ711768	FJ174530
<i>Trichobilharzia regenti</i>	<i>Radix peregra</i> (Gastropoda, Lymnaeidae)	Republica Checa	AY157244	AY157190
<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Gastropoda, Lymnaeidae)	Republica Checa, Bielorrusia	AY157245	MT708491
<i>Trichobilharzia mergi</i>	<i>Mergus serrator</i> (Aves, Anatidae)	Islandia	JX456158	JX456172
<i>Trichobilharzia</i> sp. C	<i>Lophodytes cucullatus</i> (Aves, Anatidae)	EUA	-	FJ174529
<i>Trichobilharzia</i> sp. D W376 <i>Stagnicola</i>	<i>Stagnicola</i> sp. (Gastropoda, Lymnaeidae)	Canadá	FJ174481	FJ174485
<i>Trichobilharzia stagnicolae</i>	<i>Mergus merganser</i> (Aves, Anatidae)	EUA	FJ174478	FJ174490
<i>Trichobilharzia</i> sp. E W332 <i>Stagnicola</i>	<i>Stagnicola</i> sp. (Gastropoda, Lymnaeidae)	Canadá	FJ174480	FJ174483
<i>Trichobilharzia</i> sp. PYOL010	<i>Radix rubiginosa</i> (Gastropoda, Lymnaeidae)	Tailandia	-	MW525202
<i>Anserobilharzia brantae</i>	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	EUA	FJ174466	MK433247
<i>Allobilharzia visceralis</i>	<i>Cygnus columbianus</i> (Aves, Anatidae)	EUA	EF114223	EF114224
<i>Bilharziella polonica</i>	<i>Anas platyrhynchos</i> (Aves, Anatidae)	Ucrania	AY157240	AY157186
Avian schistosomatid sp. W1285	<i>Biomphalaria sudanica</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Kenia	AY858886	AY829246
<i>Heterobilharzia americana</i>			AY157246	AY157192
<i>Schistosomatium douthitti</i>			AY157247	AY157193
<i>Schistosoma intercalatum</i>			AY157262	AY157208
<i>Schistosoma bovis</i>			FJ897156	MK757181

<i>Schistosoma haematobium</i>	AY157263	AY157209
<i>Schistosoma mattheei</i>	AY157265	AY157211
<i>Schistosoma margrebowiei</i>	AY157260	AY157206
<i>Schistosoma leiperi</i>	AY157261	AY157207
<i>Schistosoma indicum</i>	AY157258	AY157204
<i>Schistosoma spindale</i>	AY157257	AY157203
<i>Schistosoma nasale</i>	AY157259	AY157205
<i>Schistosoma rodhaini</i>	AY157256	AY157202
<i>Schistosoma mansoni</i>	AY157173	NC002545
<i>Schistosoma turkestanicum</i>	AY157254	KC456234
<i>Schistosoma edwardiense</i>	AY197344	MT886702
<i>Schistosoma incognitum</i>	AY157255	AY157201
<i>Schistosoma hippopotami</i>	AY197343	AY197346
<i>Schistosoma japonicum</i>	Z46504	EU325879
<i>Schistosoma mekongi</i>	AF465922	AY157199
<i>Schistosoma sinensium</i>	AF465924	AY157197
<i>Schistosoma malayensis</i>	AY157252	AY157198
<i>Bivitellobilharzia nairi</i>	AY858888	JQ975011
<i>Bivitellobilharzia loxodontae</i>	JN579949	JN579948
<i>Macrobilharzia macrobilharzia</i>	AY858885	AY829248
Schistosomatidae sp. W688	KF672860	-
<i>Austrobilharzia</i> sp.	JF742195	-
<i>Austrobilharzia terrigalensis</i>	AY157249	AY157195
<i>Austrobilharzia variglandis</i>	AY157250	AY157196
<i>Ornithobilharzia canaliculata</i>	AY157248	AY157194
<i>Spirorchis scripta</i>	AY222174	AY829243
<i>Learedius learedi</i>	AY604707	OK039252
<i>Hapalotrema mehrai</i>	AY604708	AY829244



4. RESULTADOS

4.1. Caracoles dulceacuícolas como hospederos intermediarios

Se colectó un total de 2.284 caracoles dulceacuícolas de seis especies provenientes de tres regiones de la zona Centro-Sur del país; Ñuble, Biobío y Los Ríos (Figura 1). Entre las especies de caracoles están: *Ancylus* sp. (Planorbidae) (n= 24) colectado desde un sitio en la región del Biobío; *Chilina dombeyana* Sowerby, 1838 (Chilinidae) colectado desde una localidad en la región del Ñuble (n= 8), tres sitios en la región del Biobío (n= 481) y dos sitios en la región de Los Ríos (n= 224); *Lymnaea* sp. (Lymnaeidae) desde una localidad en la región del Biobío (n= 56) y otro en la región de Los Ríos (n= 19); *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) (Physidae) desde tres localidades en la región del Ñuble (n= 351), dos en la región del Biobío (n= 819) y cuatro en la región de Los Ríos (n= 220); y *Potamolithus* spp. (Tateidae) desde una localidad en la región del Biobío (n= 57) y tres sitios en la región de Los Ríos (n= 24). La Tabla 3 presenta el detalle del sitio específico para cada taxón en cada región considerada en el presente estudio.

De todos los taxones de caracoles detallados anteriormente, sólo la especie *C. dombeyana* proveniente de la Laguna Chica de San Pedro de la Paz, región del Biobío, (36°50'58.509''S 73°5'5.133''O) resultó parasitada con estadios intramolusco de esquistosomas aviares, incluyendo esporoquistes y furcocercarias. La prevalencia total, considerando todos los caracoles colectados, fue de 1,53% (35/2284), mientras que la prevalencia en la especie de molusco parasitado fue de 4,91% (35/714). De los 35 caracoles parasitados, 25 liberaron un total de 3893 furcocercarias durante el período de estimulación luminosa ($I_M = 155,72$; $R = 1-908$; $A_M = 5,45$). Se describieron tres linajes de furcocercarias: I, II y III. Los Linajes I y II se describieron morfológica y molecularmente, mientras que el Linaje III solo pudo describirse morfológicamente. El Linaje I (n= 662 furcocercarias) se aisló desde cinco caracoles, el Linaje II (n= 3227 furcocercarias) desde 22 caracoles y el Linaje III (n= 4 furcocercarias) desde un caracol. Además, tres caracoles evidenciaron co-infección entre los Linajes I y II.

Se registró la presencia del simbiote *Chaetogaster* sp. (Annelida: Naididae) en cada una de las especies de caracoles colectadas en los siguientes porcentajes; 3,65% (26/713) en *C. dombeyana*, 0,79% (11/1390) en *P. acuta*, y 1,23% (1/81) en *Potamolithus* spp. En los gasterópodos *Ancylus* sp. y *Lymnaea* sp. este simbiote no fue registrado. En el caso

particular de los 35 *C. dombeyana* parasitados por esquistosomas aviare, en 9 de ellas se registró dicho simbiote.

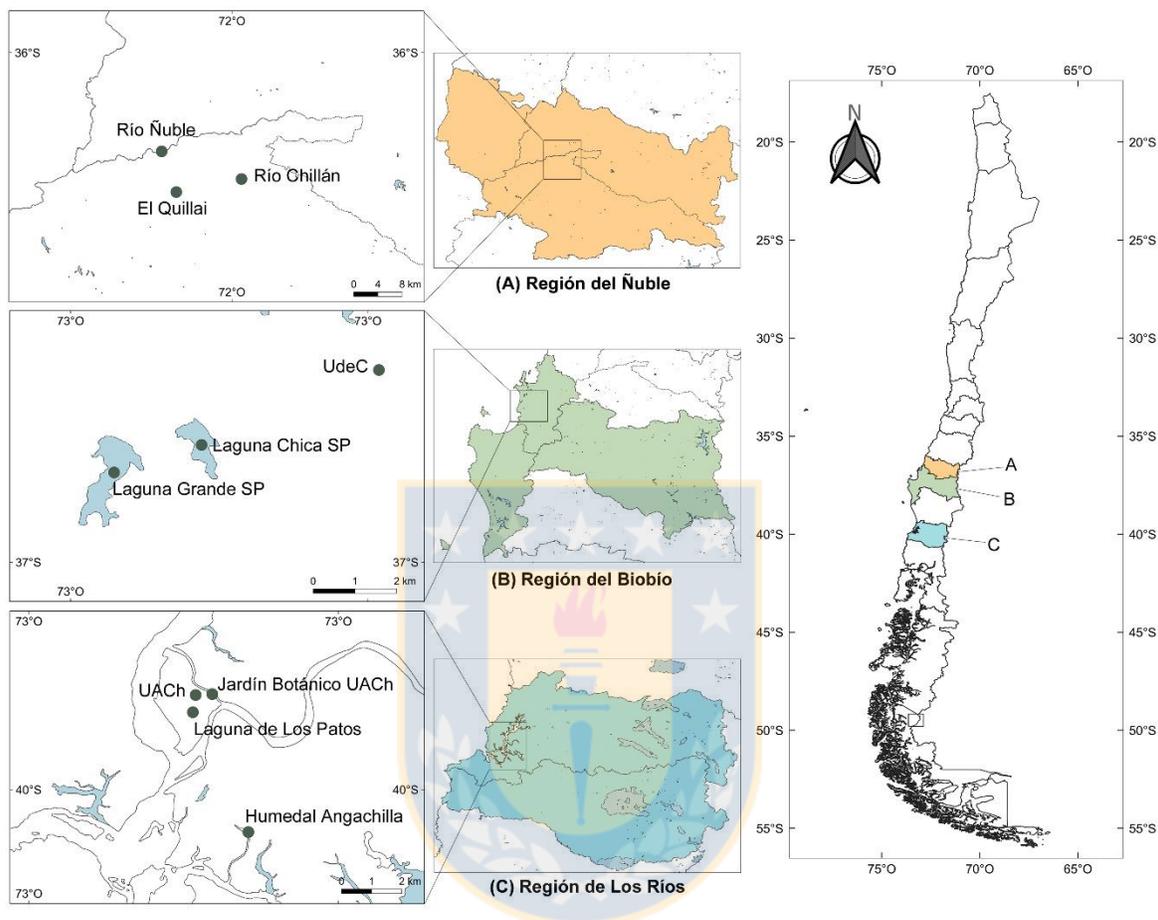


Figura 1. Mapa de las regiones consideradas en el presente estudio, especificando los sitios muestreados. Abreviaturas: UdeC= estanque de la Universidad de Concepción, UACH= potreros inundados de la Universidad Austral de Chile.

4.2. Liberación, comportamiento cercarial y sobrevida

En cuanto a la periodicidad de la emergencia cercarial, gran parte de las cercarias liberadas fueron registradas durante las horas de la mañana entre las 08 am y 12 pm, aproximadamente, mientras que sólo unas pocas cercarias se registraron durante la tarde (18:00). Los caracoles que liberaron furcocercarias fueron aquellos colectados entre noviembre 2019 y febrero 2020.

Tabla 3. Localidades consideradas en el presente estudio, incluyendo el tamaño muestral por localidad para cada especie de caracol.

Localidad	Coordenadas	Especie de caracol (n)				
		<i>Physella acuta</i>	<i>Chilina dombeyana</i>	<i>Lymnaea</i> sp.	<i>Potamolithus</i> spp.	<i>Ancylus</i> sp.
Región del Ñuble						
El Quillai	36°39'31.22"S, 72°12'11.76"O	20	0	0	0	0
Río Chillán	36°38'4.00"S, 72°4'56.54"O	1	0	0	0	0
Río Ñuble	36°34'59.40"S, 72°13'49.34"O	330	8	0	0	0
Región del Biobío						
Universidad de Concepción (Udec)	36°49'41.75"S, 73°2'13.45"O	0	25	0	0	0
Laguna Chica de San Pedro (SP)	36°50'54.34"S, 73°5'5.16"O	57	447	56	57	0
Laguna Grande de San Pedro (SP)	36°51'21.04"S, 73°6'29.85"O	762	9	0	0	24
Región de Los Ríos						
Humedal de Angachilla	39°51'23.21"S, 73°14'5.71"O	93	121	0	5	0
Jardín Botánico (Valdivia)	39°48'10.46"S, 73°14'56.07"O	6	104	0	14	0
Laguna de Los Patos (Valdivia)	39°48'35.85"S, 73°15'23.13"O	10	0	0	5	0
Universidad Austral de Chile (UACH)	39°48'11.76"S, 73°15'19.21"O	111	0	19	0	0

Tras emerger del caracol, las furcocercarias se reunieron en la zona más iluminada del pocillo, sugiriendo un comportamiento fototáctico positivo. Estas nadaron sacudiendo energicamente el cuerpo y principalmente la cola de forma circular, para luego desplazarse hacia adelante con el cuerpo, aunque no necesariamente en una dirección recta, incluso haciendo movimientos en círculos durante dicho desplazamiento. Además, algunos ejemplares, realizando los mismos movimientos descritos, pero se desplazaban con las furcas hacia adelante, e incluso alternando entre ambos movimientos. Después de unos pocos segundos de nado (~10 segundos) quedan en posición de reposo con el cuerpo en su lado ventral totalmente extendido en la superficie del agua con ayuda del acetábulo, mientras que el tallo está en un ángulo no superior a 45° respecto al cuerpo y las furcas en un ángulo cercano a los 90° respecto del tallo, con movimientos ocasionales débiles de plegamiento de estas últimas. Este comportamiento de reposo tuvo una duración más breve, de unos ~5 segundo aproximadamente, para luego reanudar el nado. Mientras tanto, otras cercarias se

adhirieron al borde del pocillo con ayuda del acetábulo permaneciendo allí por mayor tiempo (~1 minuto) con movimientos ocasionales del cuerpo y cola, siempre en asociación a la zona más superficial del agua donde llegaba con mayor intensidad la luz. No obstante, unas pocas furcocercarias se adhirieron al fondo del pocillo con ayuda de su acetábulo, manteniéndose casi en paralelo con el fondo.

Tras mover con una fuerza moderada la superficie del agua con un asa metálica durante 5-10 segundos, las furcocercarias que estaban en reposo, tanto en la superficie del agua como aquellas adheridas al pocillo, reanudaron su movimiento enérgico en la columna de agua, lo cual plantearía un comportamiento mecánicamente positivo. Al colocar las furcocercarias entre cubre- y portaobjetos, varias continuaron nadando hasta que el exceso de agua fue removido con papel absorbente, y tras ello comenzaron a adherirse con su acetábulo al cubreobjetos, iniciando la liberación enzimática desde el órgano cefálico. Tras unos 10 minutos bajo el cubreobjetos desprendieron su cola y el movimiento de la furcocercaria comenzó a disminuir paulatinamente hasta cesar totalmente, dando paso a la degradación de la pared corporal. Todo el comportamiento descrito fue replicado por los Linajes I y II de furcocercarias aislados. Para el caso del Linaje III no se caracterizó su comportamiento.

En relación con la sobrevivencia de las furcocercarias, teniendo en consideración desde el momento en que fueron liberadas hasta el hallazgo de furcocercarias muertas en el fondo del pocillo, se sugiere que estas no son capaces de sobrevivir más allá de 24 horas a T° ambiente bajo las condiciones del laboratorio detalladas en el presente estudio.

4.3. Descripción morfológica de los estadios intramolusco

a. Esporoquistes

Los esporoquistes se encontraron asociados a la glándula digestiva de los caracoles, y cuando la parasitosis con estos era masiva, abarcaban además las áreas circundantes a dicho órgano como por ejemplo el buche (Figura 2). Estos se organizaban como una red, adhiriéndose profundamente al tejido digestivo del caracol ya que la única forma de removerlos era bien rompiendo los esporoquistes o desgarrándolos con el tejido del molusco. Al ser observadas en detalle estas presentaban movimientos pulsátiles débiles y tras romperse, liberaban las furcocercarias que estaban desarrollándose en su interior. Algunos especímenes fueron dispuestos entre porta- y cubreobjetos para observarlos bajo

microscopio. Allí se pudo constatar el desarrollo de furcocercarias Schistosomatidae en su interior, contándose hasta 4 cercarias oceladas, las cuales bajo la presión del cubreobjetos se movían de forma muy activa, por lo cual probablemente estos eran los responsables del movimiento observado en los esporoquistes. Estos esporoquistes eran grisáceos, de pared delgada y con forma tubular, con una longitud máxima de unos 5 mm, la superficie corporal era lisa en toda su extensión.

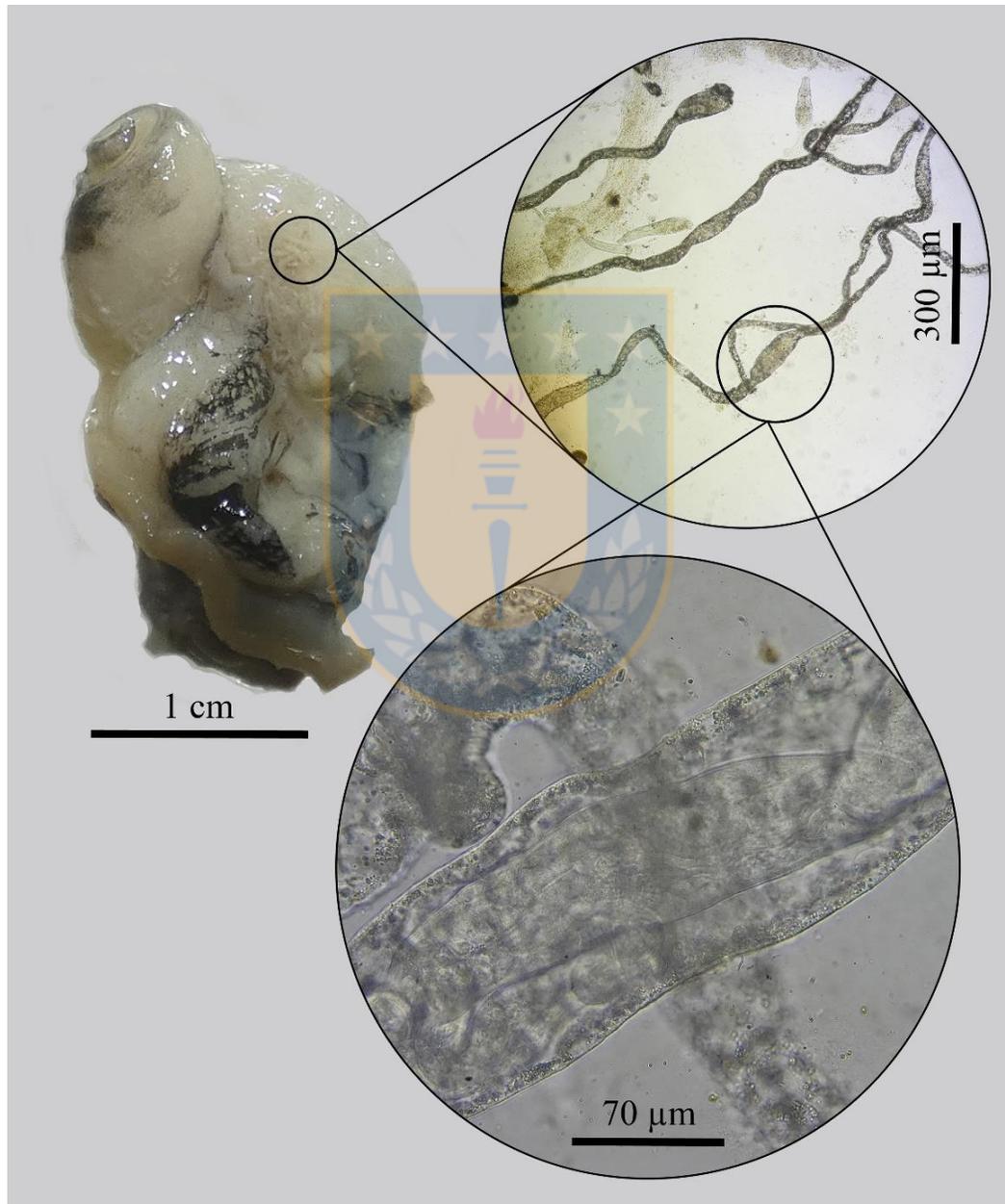


Figura 2. Esporoquistes en red penetrando la glándula digestiva del caracol *Chilina dombeyana*.

b. *Furcocercarias*

Las furcocercarias presentaron un cuerpo fusiforme espinoso, una cola con un tallo delgado y largo compuesto de múltiples núcleos y células dispuestas diagonalmente una frente a la otra, además de presentar dos furcas. Presentaron un par de ocelos pigmentados conformados por unas pocas células circulares entre el límite del primer y segundo tercio del cuerpo. En el tercio anterior del cuerpo se observa el órgano de penetración notorio de desarrollo muscular variable, desde la cual son liberados los componentes enzimáticos durante la penetración cutánea. Presentaron un acetábulo circular de marcado desarrollo, muscular y pulsátil. El cuerpo y tallo de la cola carecen de un velo natatorio, mientras que las furcas presentaron un velo natatorio delgado sin espinas a lo largo de toda su superficie dorso-ventral, extendiéndose levemente desde el borde caudal de cada furca. Tallo compuesto por múltiples células fusiformes organizadas de forma diagonal en dos columnas, siendo separadas entre sí por un canal delgado y central. El canal excretor desemboca en el borde posterior de las furcas. Se determinó la presencia de cinco pares de glándulas de penetración las cuales se organizaron como se detalla a continuación: dos pares de gran tamaño anterior al acetábulo, otras dos pequeñas en ubicación lateral respecto al mismo órgano, otro par de glándulas pequeñas posterior al acetábulo, y finalmente otro par de glándulas de mayor tamaño que se extendían hasta el borde anterior de la vesícula excretora. Los ductos de estas glándulas convergían con anterioridad al acetábulo, pasando de forma ondulada entre los ocelos, hasta desembocar en el borde posterior del órgano cefálico de penetración (Figura 3). Esta organización de dichas glándulas fue compartida entre todas las furcocercarias aisladas.

Respecto a las mediciones y proporciones entre estructuras, se pudieron identificar tres linajes. El Linaje I se aisló desde cinco caracoles, el Linaje II se reportó en 22 caracoles, y finalmente el Linaje III se aisló sólo desde un caracol con un total de cuatro furcocercarias. Así mismo, en tres caracoles se reportó una co-infección entre los Linajes I y II. Las características de estos linajes se detallan a continuación (Figuras 4-7, Tabla 4).

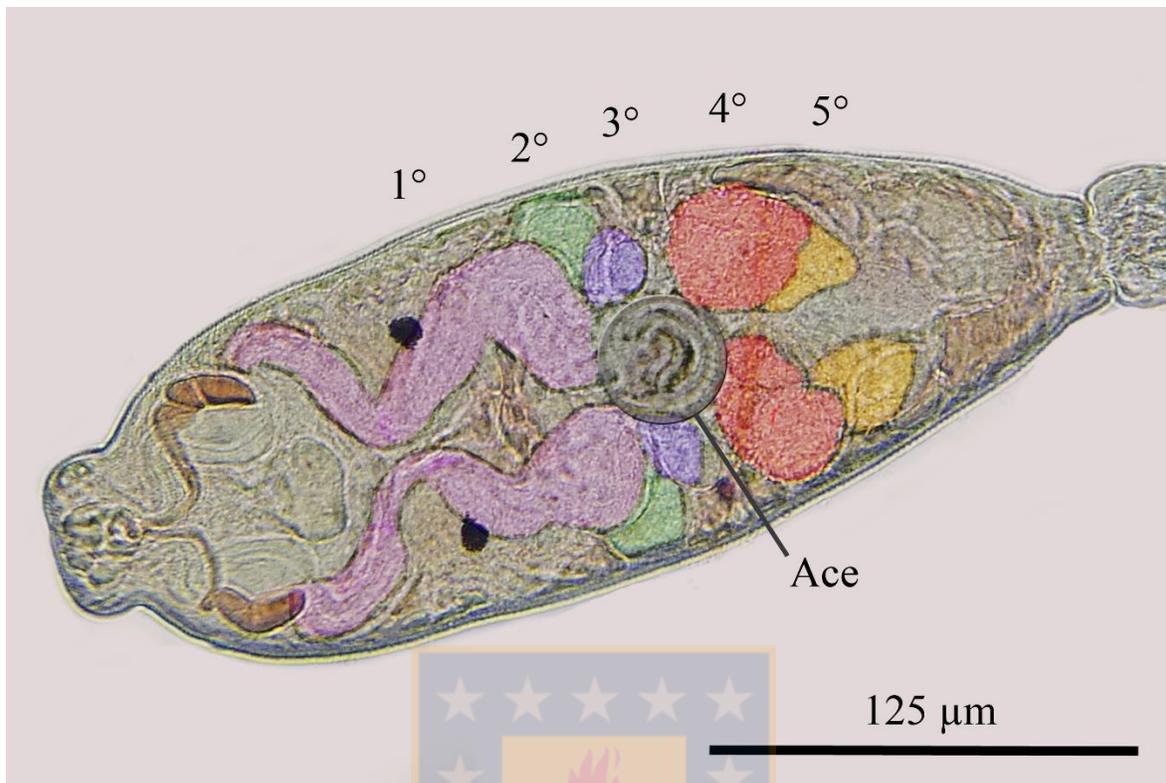


Figura 3. Furcocercaria Schistosomatidae. Se destaca con diferentes colores la organización de las glándulas de penetración.

- *Linaje I*

Las furcocercarias montadas presentaron las siguientes características bajo la microscopía óptica: cuerpo notoriamente más ancho respecto al tallo y cubierto homogéneamente por pequeñas espinas en su superficie, ocelos redondeados pigmentados ubicados en el segundo tercio. Órgano de penetración con base muscular muy desarrollada, pudiendo evidenciarse las fibras musculares transversales. El contenido de las 1° a 4° par de glándulas de penetración es de gránulos grandes, mientras que el último par están compuestos por gránulos finos y hialinos. Primordio genital evidente a la tinción con Alum Carmín pero no con la tinción Rojo Neutral. Éste es semi-circular, compuesto de múltiples células organizadas de forma compacta y se ubica casi inmediatamente caudal al borde posterior del acetábulo. Cuerpo casi de la misma longitud que el tallo. Las furcas son de longitud considerable, miden aproximadamente la mitad de la longitud del tallo.

Se caracterizó el sistema protonefridial compuesto por unas células ciliadas llamadas células flama, las cuales se organizaron con cinco pares de células flama en el cuerpo y otro

par en el tallo. Las ubicadas en el cuerpo se organizaron de la siguiente forma: dos pares de células flama ubicados en el área entre los ocelos y acetábulo, con el primer par inmediatamente posterior a los ocelos y el otro par a media distancia entre los ocelos y el acetábulo; y otros tres pares de células flama posterior al acetábulo, con el primer par a la altura del borde posterior del acetábulo, otro a media distancia, y el tercer par lateral a la pequeña vesícula excretora. Además, el último par de células flama se ubicó al inicio del tallo, poco después de su unión con el cuerpo de la cercaria. Dicho lo anterior se plantea la siguiente fórmula protonefridial: $2[(2)+(3)+(1)]= 12$ (Figuras 4A y 5A, B).

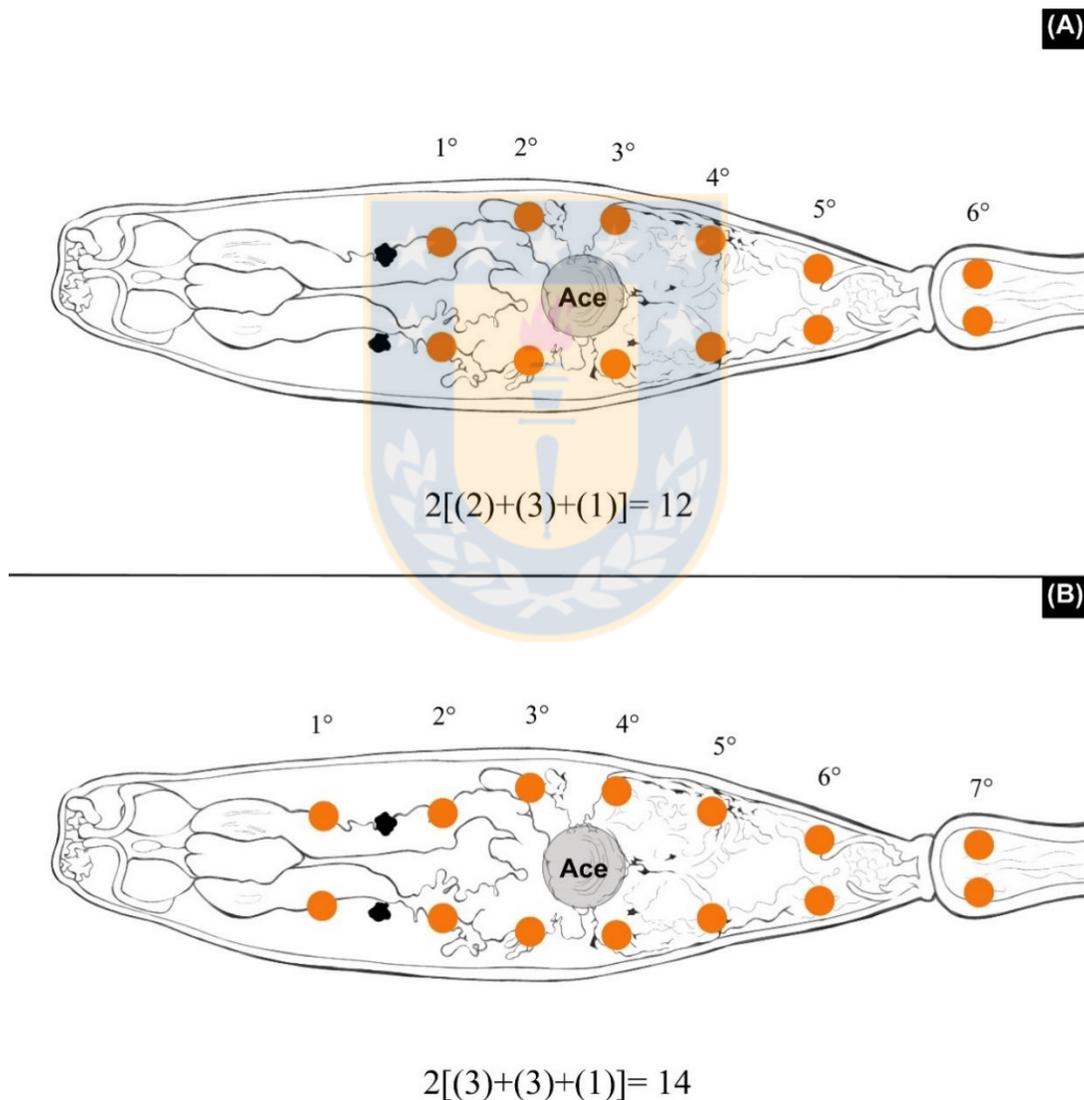


Figura 4. Organización de las células flama en el cuerpo y tallo de la cola del Linaje I (A) y linaje II (B). Abreviatura: Ace= acetábulo.

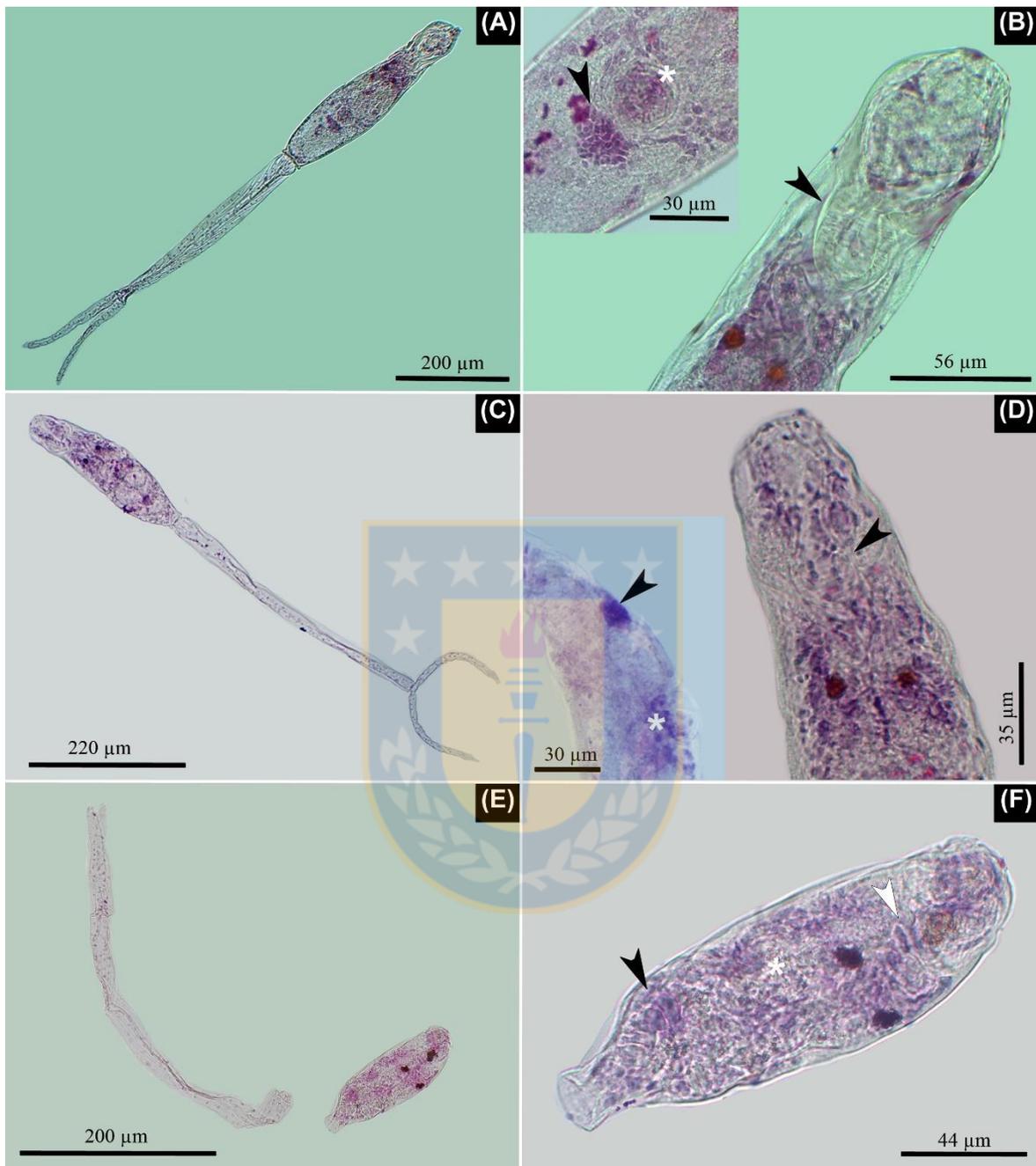


Figura 5. Imágenes microscópicas de los linajes aislados y teñidos con Alum Carmín. (A-B) Linaje I. (A) Furcocercaria *in toto*, nótese la longitud similar del cuerpo y del tallo de la cola. (B) Órgano de penetración en el tercio anterior del cuerpo con su musculatura bien desarrollada la cual es evidente en su base (punta de flecha). Imagen insertada: Detalle de la región acetabular. Nótese la proximidad entre el acetábulo (asterisco) y el primordio genital (punta de flecha). (C-D) Linaje II. (C) Furcocercaria *in toto*, nótese la diferencia entre la longitud del cuerpo y el tallo de la cola, la cual es

casi el doble que la primera. (D) Tercio anterior del cuerpo donde es evidente el órgano de penetración (punta de flecha), sin embargo, su desarrollo muscular es menor respecto al linaje I. Imagen insertada: Nótese la distancia entre el acetábulo (asterisco) y el primordio genital (punta de flecha). (E-F) Linaje III. (E) *Furcocercaria in toto*, esta cercaria fue el linaje más pequeño aquí aislado. (F) Cuerpo con un órgano de penetración débilmente desarrollado (punta de flecha blanca). Nótese la corta distancia entre el acetábulo (asterisco) y el primordio genital (punta de flecha negra).

En cuanto a las características del tegumento observadas en el MEB (Figura 6), se puede destacar la presencia de pequeñas espinas densamente organizadas sobre el tegumento del cuerpo, principalmente en la zona anterior al acetábulo, y con un mayor número sobre el área del órgano cefálico, el cual además posee un aspecto globoso. Estas espinas fueron disminuyendo en densidad en la zona ventral y lateral del cuerpo, hasta desaparecer en torno al borde posterior del cuerpo, en la unión con el tallo caudal. En el caso de la zona post-acetabular dorsal, dicha disminución de las espinas se observa inmediatamente a la altura del acetábulo para luego desaparecer totalmente a poca distancia. En las zonas laterales esta disminución gradual en las espinas se torna absoluta a media distancia entre el acetábulo y borde caudal del cuerpo. Mientras que, en la zona ventral post-acetabular, el número de espinas se reduce gradualmente, hasta desaparecer recién poco antes de llegar al borde caudal del cuerpo. En el borde apical del órgano cefálico se pueden observar las múltiples aperturas desde donde se excreta el contenido enzimático de dicho órgano. Así mismo se observan algunas estructuras similares a papilas bordeando dichas aperturas. El acetábulo extruido carece de espinas, excepto en su borde apical, donde unas pocas espinas pequeñas y más cortas que las del cuerpo se presentan de forma irregular en su organización, aunque muy juntas entre sí. Adicionalmente, el tegumento peri-acetabular del cuerpo presenta una menor concentración de espinas en comparación al resto del cuerpo. El tegumento del cuerpo tiene un aspecto poroso en toda su extensión. El tallo caudal está densamente cubierto de espinas de mayor tamaño que las del cuerpo, presentándose de forma densa y en toda su extensión. Adicionalmente, el tegumento del tallo caudal, en su primer tercio, está cubierto por una malla con aspecto de panal de abejas, patrón que va desapareciendo gradualmente hasta ser apenas perceptible en el segundo tercio del tallo y totalmente ausente en el último tercio. Las furcas también presentan espinas, aunque más finas y algo más largas que las del tallo caudal,

no obstante, su densidad es similar. En estas furcas se observa claramente la presencia de un velo natatorio dorso-ventral el cual carece de espinas.

- *Linaje II*

Las furcocercarias montadas presentaron las siguientes características bajo la microscopía óptica: cuerpo cubierto homogéneamente por pequeñas espinas en su superficie, el ancho del cuerpo es levemente mayor respecto al tallo. Ocelos redondeados pigmentados ubicadas en el segundo tercio del cuerpo. Órgano de penetración con base muscular débilmente desarrollada. Se observan tres pares de papilas sin pelos sensitivos evidentes en el borde del cuerpo; dos pares en el borde anterior del órgano de penetración y el otro par ubicado de forma lateral a la base de dicho órgano, uno a cada lado. El contenido del primer par de glándulas de penetración, craneal al acetábulo, es de gránulos gruesos, incluso con algunos pigmentos oscuros en ciertas áreas, distribuyéndose hasta la base del órgano de penetración. Mientras tanto las demás glándulas tienen gránulos más finos y hialinos. El primordio genital es evidente a la tinción con Alum Carmín pero no con la tinción Rojo Neutral. Éste es ovalado, compuesto de múltiples células organizadas de forma compacta y se ubica aproximadamente a media distancia entre el acetábulo y borde caudal del cuerpo. Largo del cuerpo mide aproximadamente la mitad de la longitud del tallo. Furcas cortas respecto al tallo, miden aproximadamente un tercio de su longitud.

El sistema protonefridial está organizado en seis pares de células flama en el cuerpo y otro par en el tallo. Las ubicadas en el cuerpo se organizaron de la siguiente forma: el primer par de células flama se ubica a poca distancia del borde posterior del órgano cefálico, en los bordes laterales del cuerpo, siendo en algunos especímenes difíciles de localizar; el segundo par de células flama se ubica inmediatamente posterior a los ocelos y el otro par aproximadamente a media distancia entre los ocelos y el acetábulo; y los otros tres pares de células flama están en el área post-acetabular, con el primer par a la altura del borde posterior del acetábulo, otro a media distancia, y el tercer par craneal a la pequeña vesícula excretora. Además, el último par de células flama se ubicó al inicio del tallo, poco después de su unión con el cuerpo de la cercaria. Dicho lo anterior se plantea la siguiente fórmula protonefridial: $2[(3)+(3)+(1)]= 14$ (Figuras 4B y 5C, D).

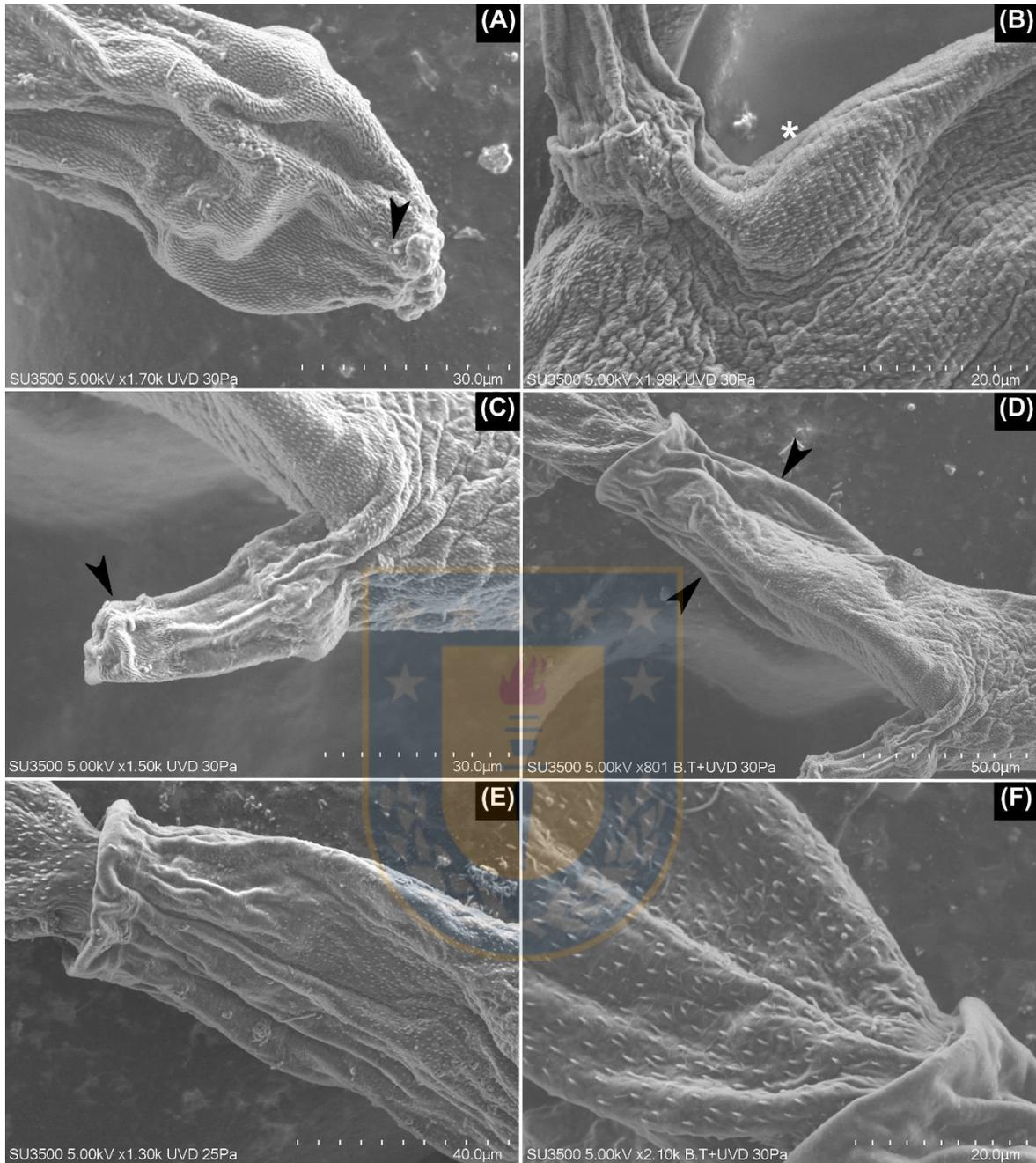


Figura 6. Imágenes MEB del tegumento del linaje I. (A) Órgano de penetración en el que se observan un par de estructuras tipo papilas en el borde del órgano (punta de flecha). (B) Tegumento del cuerpo con aspecto poroso (asterisco) que se observa claramente posterior al acetábulo. (C) Acetábulo cubierto en su extremo exterior por pequeñas espinas densamente agrupadas (punta de flecha) que contrastan con el resto del acetábulo donde no se observan espinas. (D-E) Tercio posterior del cuerpo donde las espinas desaparecen gradualmente (puntas de flecha) hasta ya no presentarse el borde posterior. (E) Obsérvese también el mayor tamaño de las espinas del tallo de la cola en comparación con las del cuerpo. (F) Tallo de la cola con una delicada malla en forma de panal sobre su tegumento.

El cuerpo de las furcocercarias observados en el MEB (Figura 7) presenta un tegumento cubierto por pequeñas espinas densamente agrupadas en toda su extensión y notoriamente concentradas en el área del órgano cefálico, el cual tiene una forma alargada. En dicho órgano se observaron algunas estructuras similares a papilas circundando sus aperturas glandulares. Así mismo, en la base del mismo órgano se observaron un par de pequeñas aberturas. Es probable que en estas se hayan encontrado insertas algunas estructuras tipo pelo sensitivo, sin embargo, estas no fueron observadas en el MEB. El acetábulo se caracteriza por la presencia de pequeñas espinas bordeando su apertura, mientras que el tegumento de su tronco carece de espinas en su superficie. Así mismo hay dos pequeños parches de tegumento, uno pre-acetabular y otro post-acetabular, los cuales están desprovistos de espinas. Adicionalmente, en el parche pre-acetabular se observaron dos estructuras similares a papilas, uno a cada lado en el borde craneal. El cuerpo posee espinas en toda su extensión dorso-ventral como lateral, incluyendo el borde caudal del cuerpo. La superficie del tegumento está cubierta en toda su extensión de pequeños poros. El tallo caudal presenta espinas en prácticamente toda su extensión, las cuales son de mayores dimensiones y más espaciadas entre sí que las presentes en el cuerpo. No obstante, en una pequeña área inmediatamente posterior a la unión con el cuerpo se registró ausencia de espinas, las cuales comienzan a aparecer a corta distancia. En el primer cuarto del tallo, y en torno a las primeras espinas, se observa un patrón asemejando un panal de abeja, el cual posteriormente ya no es perceptible. En dirección anterior a posterior, las espinas del tallo disminuyen en tamaño y densidad desde el segundo tercio. Las furcas también presentan su tegumento cubierto de espinas espaciadas entre sí en toda su extensión, y de un tamaño mayor a las presentes en el último segmento del tallo caudal. Además, se observa claramente la presencia de un velo natatorio dorso-ventral sin espinas.

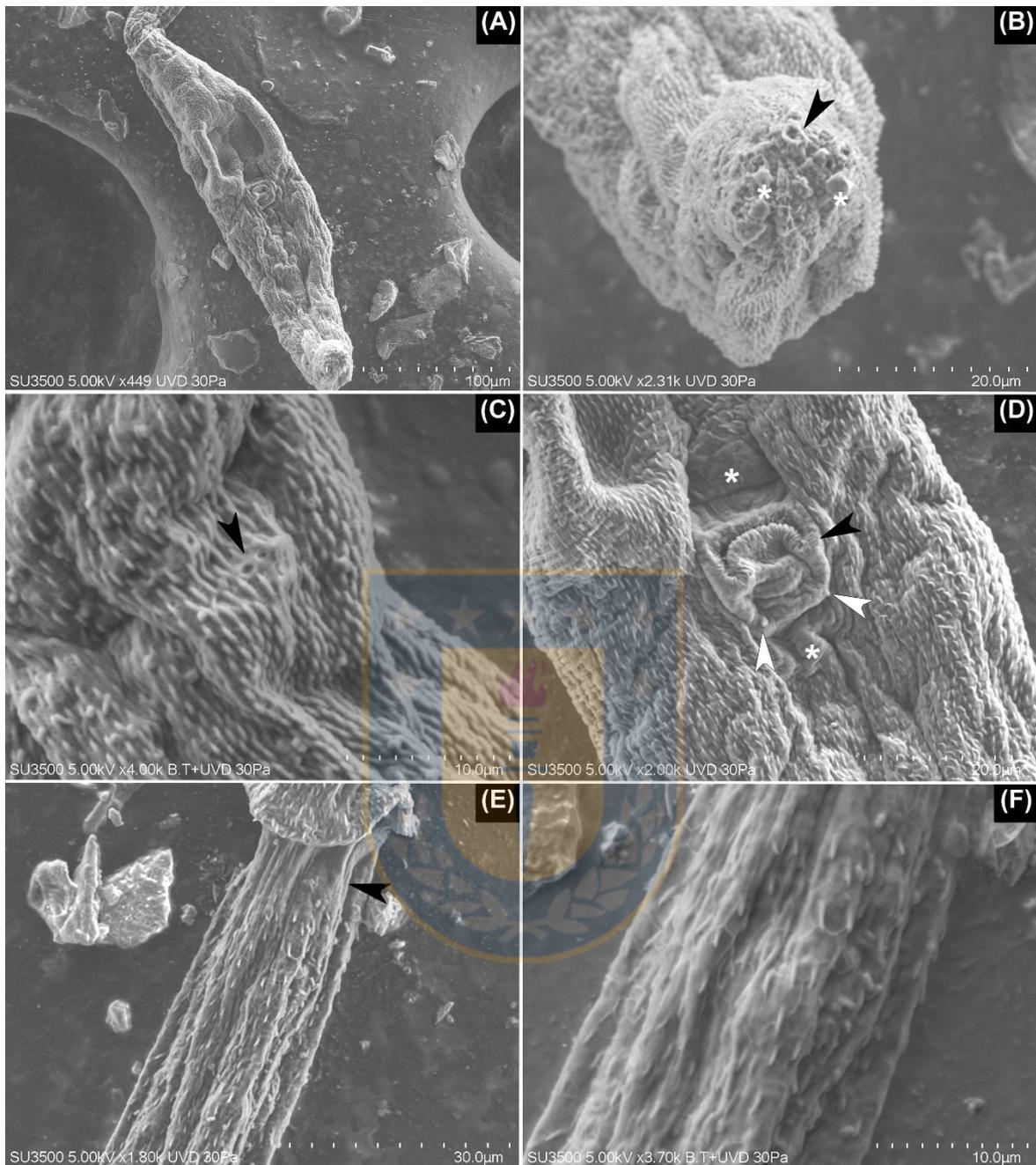


Figura 7. Imágenes MEB del tegumento del linaje II. (A) Vista ventral del cuerpo de la furcocercaria completamente cubierto de pequeñas espinas sobre su tegumento. (B) Vista apical del órgano de penetración con sus aberturas glandulares (punta de flecha) y algo de contenido glandular sobre estos (asteriscos). (C) Porción basal del órgano de penetración en la que se observan estas dos aberturas, probablemente portadoras de pequeños pelos sensitivos. (D) Acetábulo invertido con algunas espinas pequeñas sobre su borde (punta de flecha negra). Nótese la presencia de dos parches carentes de espinas, una anterior y otra posterior al acetábulo (asteriscos). En la base del acetábulo se observan un par de estructuras parecidas a papilas (puntas de flecha blancas). (E) En el tercio anterior del tallo

de la cola se aprecia una pequeña zona carente de espinas (punta de flecha). (F) Detalle de la delicada malla en forma de panal sobre el tegumento del tallo de la cola, que también se ve en la figura 3E.

- *Linaje III*

Las furcocercarias montadas presentaron las siguientes características bajo la microscopía óptica: cuerpo de aspecto fusiforme, cubierto homogéneamente en su superficie por espinas apenas perceptibles, ocelos ovalados pigmentados ubicados en el segundo tercio. Órgano de penetración pequeño con base pobremente desarrollada desde el punto de vista muscular. El contenido de las glándulas de penetración es granular, hialino, distribuyéndose en casi toda la extensión del cuerpo hasta la base del órgano de penetración. Además, se observaron unos pocos gránulos oscuros concentrados en la base del órgano de penetración. Primordio genital evidente con la tinción con Alum Carmín, triangular, compuesto por cuatro células organizadas de forma compacta y se ubica aproximadamente a media distancia entre el acetábulo y borde posterior del cuerpo. Largo del cuerpo aproximadamente la mitad de la longitud del tallo. Furcas cortas respecto al tallo, miden aproximadamente un tercio de su longitud. Es la más pequeña de las furcocercarias reportadas en el presente estudio (Figura 5E, F). Debido al reducido número de furcocercarias se optó por no realizar tinciones vitales, no pudiendo determinarse el número de glándulas de penetración ni la fórmula protonefridial. Así mismo, no pudo realizarse su montaje para MEB.

Tabla 4. Medidas (en μm) de las furcocercarias registradas anteriormente en especies de *Chilina*, incluidos material del presente estudio. Adaptado de Flores *et al.* (2015). Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis.

Taxón	Linaje I	Linaje II	Linaje III	<i>Species inquirenda</i> *	<i>C. chilinae I</i>	<i>C. chilinae II</i>	<i>C. chilinicola</i>	Linaje 1	Linaje 2	Linaje 2	Linaje 2	Linaje 3
Hospedador	<i>C. dombeyana</i>	<i>C. dombeyana</i>	<i>C. dombeyana</i>	<i>C. dombeyana</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>C. gibbosa</i>	<i>C. gibbosa</i>	<i>C. gibbosa</i>	<i>C. perrieri</i>	<i>Chilina</i> sp.	<i>C. dombeyana</i> , <i>C. neuquenensis</i>
Localidad (país)	Laguna Chica de San Pedro (CHI)	Laguna Chica de San Pedro (CHI)	Laguna Chica de San Pedro (CHI)	Laguna Chica de San Pedro (CHI)	Delta Paraná (AR)	Delta Paraná (AR)	Reservorio Pellegrini (AR)	Reservorio Pellegrini, Lago Nahuel Huapi (AR)	Reservorio Pellegrini (AR)	Río Santa Cruz (AR)	Larga Larga (AR)	Lago Mascardi (AR)
n cercarias	23	96	1	-	-	-	-	-	10	25	5	20
L. total	959,4-1.062 (1.010,06 \pm 31,31)	750-937 (839,07 \pm 41,98)	685	684-1.212	930	990	1.010	1.045-1.140	805-875	998-1.085	1.056-1.114	816-931
L. cuerpo	342-432 (378,24 \pm 22,12)	185-315 (262,45 \pm 24,36)	175	-	280	280	330	400-435	245-270	259-317	259-278	269-307
A. cuerpo	61-92 (79,59 \pm 8,92)	45-84 (63,92 \pm 7,35)	57	-	70	70	110	90-100	60-65	58-77	67-77	83
L. tallo de la cola	354-467 (422,21 \pm 29,04)	358-488 (422,55 \pm 26,35)	387	-	650	530	510	410-450	405-450	528-576	595-624	582-624
L. furcas	193-228 (209,61 \pm 9,39)	131-176 (155,47 \pm 9,28)	123	-	-	180	170	235-290	125-175	163-211	182-211	192-240
L. x A. órgano de penetración	109-135 (119,82 \pm 7,31) x 40-62 (51,59 \pm 5,07)	54-93 (73,55 \pm 6,07) x 28-52 (39,19 \pm 4,26)	49 x 35	-	-	-	90 x 50	100-113 x 50-63	65-85 x 38-45	77 x 40	96-108 x 36-43	99 x 48
D. ocelos	7-11 (9,18 \pm 1,05)	6-10 (8,22 \pm 0,96)	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Posición ocelos	2do tercio	2do tercio	2do tercio	-	-	-	1er tercio	2do tercio				
Células flama	12	14	-	-	14	-	14	-	-	12	-	12
D. Ace	22-39 (31,86 ± 3,83)	20-36 (26,31 ± 3,01)	26	-	-	25	35	35-40	20-28	24-29	24-34	29-38
Distancia Ea-Ace	199-270 (234,95 ± 19,58)	91-188 (143,69 ± 17,13)	73	-	200	200	180	250-300	130-150	153	182-202	193
L. cuerpo: L. tallo de la cola	1: 0,76-1,1 (0,9 ± 0,1)	1:0,46-0,78 (0,62 ± 0,07)	1:0,45	-	1:0,43	1:0,52	1:0,65	1:0,9-1	1:0,5-0,6	1:0,5-0,6	1:0,4-0,5	1:0,4-0,6
L. tallo de la cola:	1:1,65-2,19 (2,02 ± 0,14)	1:2,32-3,14 (2,72 ± 0,17)	1:3,15	-	-	1:2,9	1:3	1:1,5-1,8	1:2,3-3,4	1:2,5-3,4	1:3-3,3	1:2,4-3,3
L. furcas	15-29 (21,87 ± 3,49)	15-34 (21,25 ± 3,67)	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. prim	0-12 (4,87 ± 2,94)	13-46 (32,73 ± 6,95)	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distancia Ace-prim	E96	E96	E96	?	H70	H70	E96	FC	FC	FC	FC	FC
Fijador utilizado	AC, RN	AC, RN	AC, RN	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Tinción utilizada	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio	[1]	[2]	[2]	[3]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]
Referencia												

Símbolos y abreviaturas: *= citado as *Trichobilharzia* sp.; AR= Argentina; CHI= Chile; L= longitud; A= ancho; D= diámetro; Ea= Extremo anterior; Ace= Acetábulo; prim= primordio genital; ?= información no especificada por autores. Fijadores: E96= etanol 96%; H70= agua caliente a 70°C; FC= formalina 4% caliente. Tinciones: AC= alum carmín; RN= rojo neutral. Referencias: [1] Valdovinos y Balboa (2008), [2] Szidat (1951), [3] Martorelli (1984), [4] Flores *et al.* (2015).

4.4. Relaciones filogenéticas de las furcocercarias aisladas

Los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana de ambos genes soportaron el diagnóstico morfológico de dos de los esquistosomas aviares aislados, Linajes I y II. Estos linajes fueron asociados con otros dos linajes registrados en Argentina por Flores *et al.* (2015, 2021). El Linaje I se relacionó con el linaje 1 y *Nasusbilharzia melancorhypha* Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021 reportados en Argentina (Flores *et al.* 2015, 2021), y el Linaje II se asoció con el linaje 2 reportado en Argentina (Flores *et al.* 2015). En ambos casos con un alto soporte nodal para MV e IB. Estos linajes estuvieron cercanamente relacionados al clado DAS (antes BTGD), el mayor clado de esquistosomas aviares acorde a Brant y Loker (2009a). Los análisis filogenéticos de MV e IB para el gen COI mostraron que los tres linajes conocidos de esquistosomas relacionados a *Chilina* se agruparon en un gran clado monofilético, separados del resto de taxones asociados al clado DAS, aunque con un soporte nodal moderado (71/0.82). El Linaje II del presente estudio y el linaje 3 de Argentina están cercanamente relacionados, aunque con un soporte nodal moderado (Figura 8). En el caso del gen 28S, los tres linajes se separaron en tres clados diferentes, cada uno bien soportado (100/1, cada uno), tal como en el análisis filogenético del gen COI. Sin embargo, el Linaje I conformó un clado bien soportado con una ubicación basal a la mayoría de las especies del clado DAS, excepto por *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895) Looss, 1899. Por otro lado, los esquistosomas aviares del Linaje II estuvieron cercanamente relacionados, y con un soporte nodal robusto, con los esquistosomas aviares del linaje 3 de Argentina y otros esquistosomas aviares no identificados transmitidos por diferentes familias de gasterópodos (Figura 9). Además, los análisis de MV e IB de las secuencias concatenadas mostraron un árbol de topología similar al de 28S; Linajes II y 3 cercanamente relacionados en un clado monofilético con un soporte nodal robusto, y Linaje I basal a casi todo el clado DAS excepto por *B. polonica*, con un soporte nodal robusto, incluyendo el género *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl y Skírnisson, 2006, el cual parasita cisnes (Figura 10).

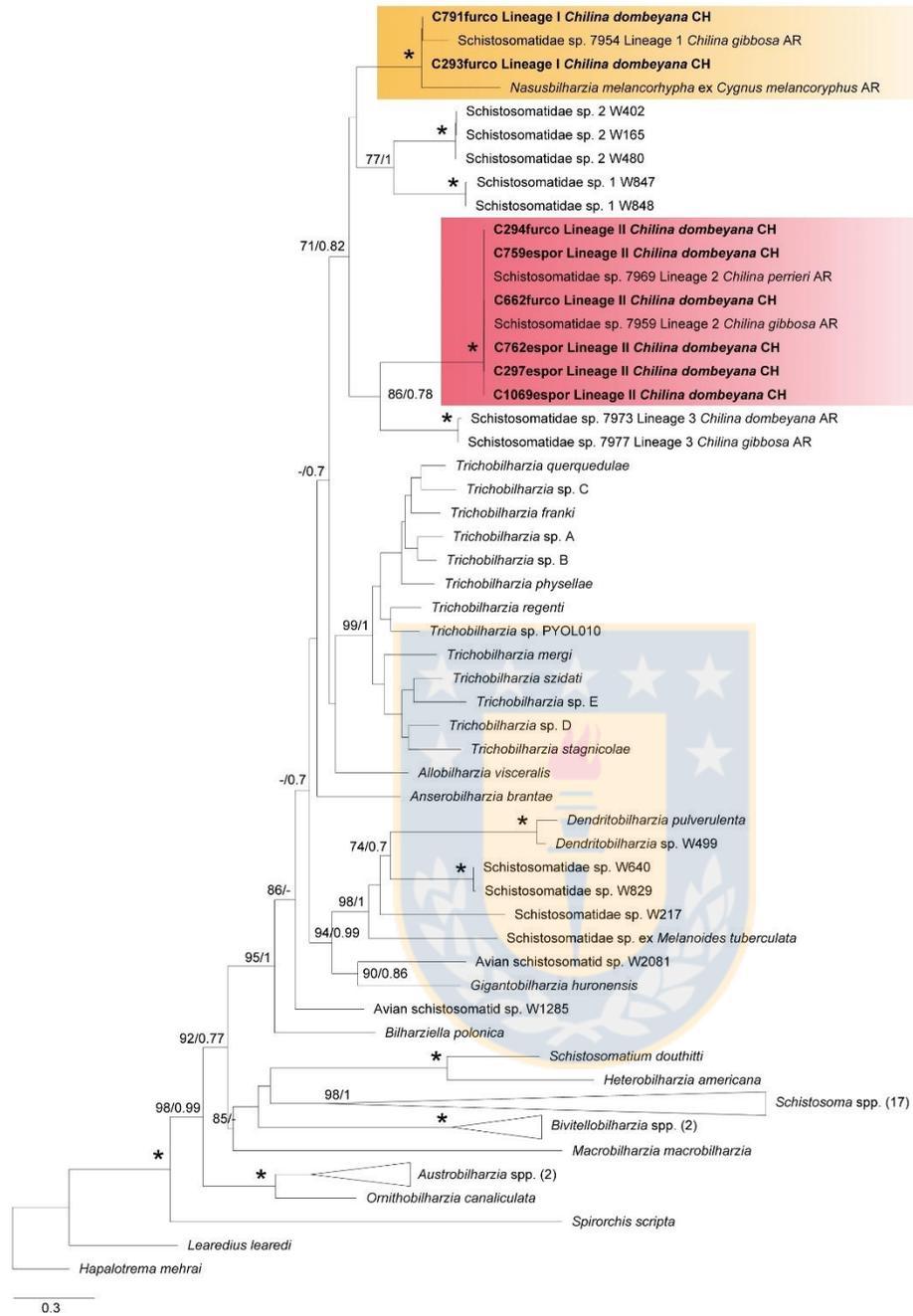


Figura 8. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen COI. Esta filogenia fue inferida de un alineamiento de 1.188 pb. Los modelos de sustitución calculados para MV e IB fueron TIM2+F+I+G4 (part1), GTR+F+I+G4 (part2), TIM2+F+I+G4 (part3), y M_{201} , M_{138} , M_{162} , M_{189} , M_{203} , M_{134} , M_{193} (part1), M_{29} , M_{92} , M_{68} , M_{71} , M_{81} , M_{54} , M_{180} (part2), M_{125} , M_{191} , M_{193} , M_{200} , M_{189} , M_{203} , M_{166} , M_{64} (part3), respectivamente. Los mejores modelos se eligieron usando el Criterio de Información Bayesiano (CIB). Los valores Bootstrap ≥ 70 (izquierda) and probabilidades posteriores ≥ 0.7 (derecha) se

presentan en cada nodo. Un asterisco (*) indica soporte completo (100/1). Las secuencias generadas en el presente estudio se indican en negrita. Los grupos externos (“outgroups”) con más de dos secuencias se colapsaron con el número de secuencias detalladas entre paréntesis.

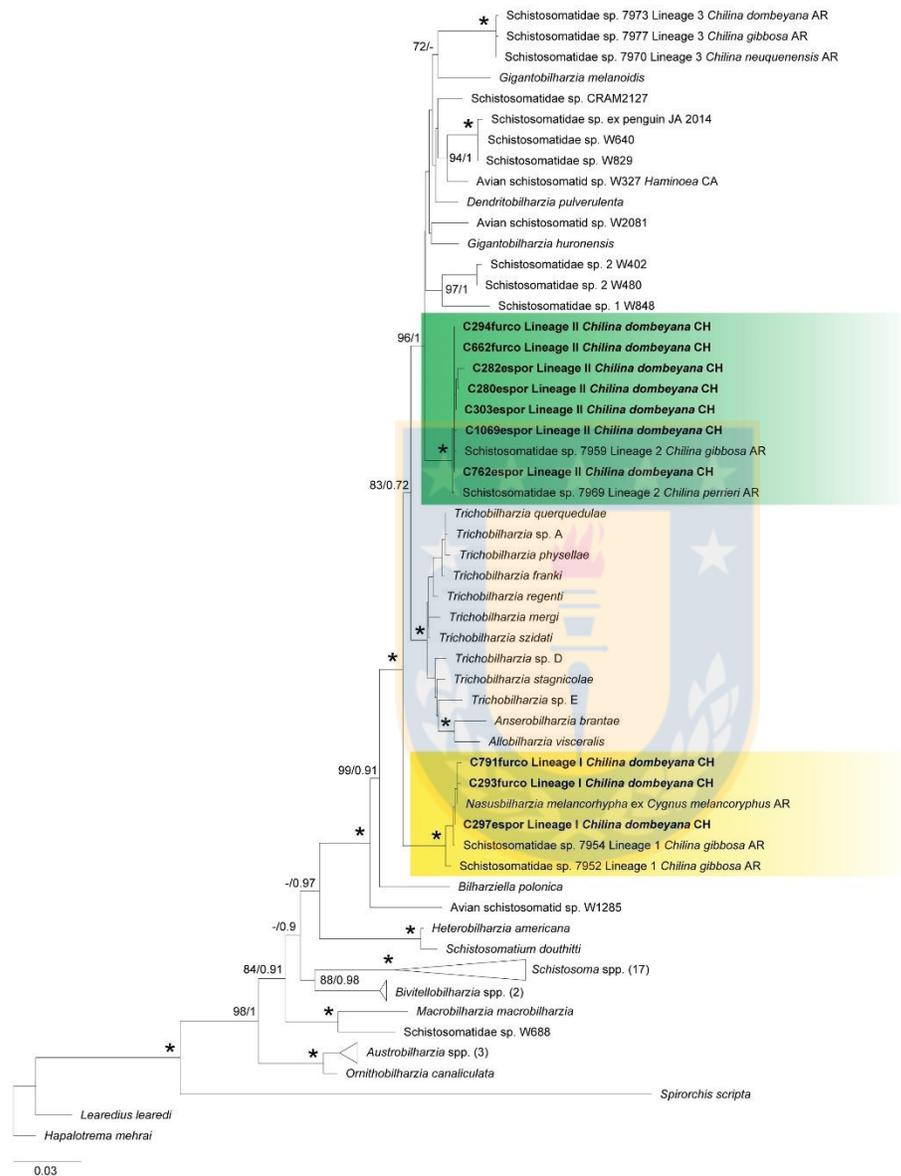


Figura 9. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen 28S. Esta filogenia fue inferida de un alineamiento de 1.699 pb. Los modelos de sustitución calculados para MV e IB fueron GTR+F+G4, y M_{203} , M_{198} , M_{200} , respectivamente. Los mejores modelos se eligieron usando el Criterio de Información Bayesiano (CIB). Los valores Bootstrap ≥ 70 (izquierda) and probabilidades posteriores ≥ 0.7 (derecha) se presentan en cada nodo. Un asterisco (*) indica soporte completo (100/1). Las secuencias generadas

en el presente estudio se indican en negrita. Los grupos externos (“outgroups”) con más de dos secuencias se colapsaron con el número de secuencias detalladas entre paréntesis.

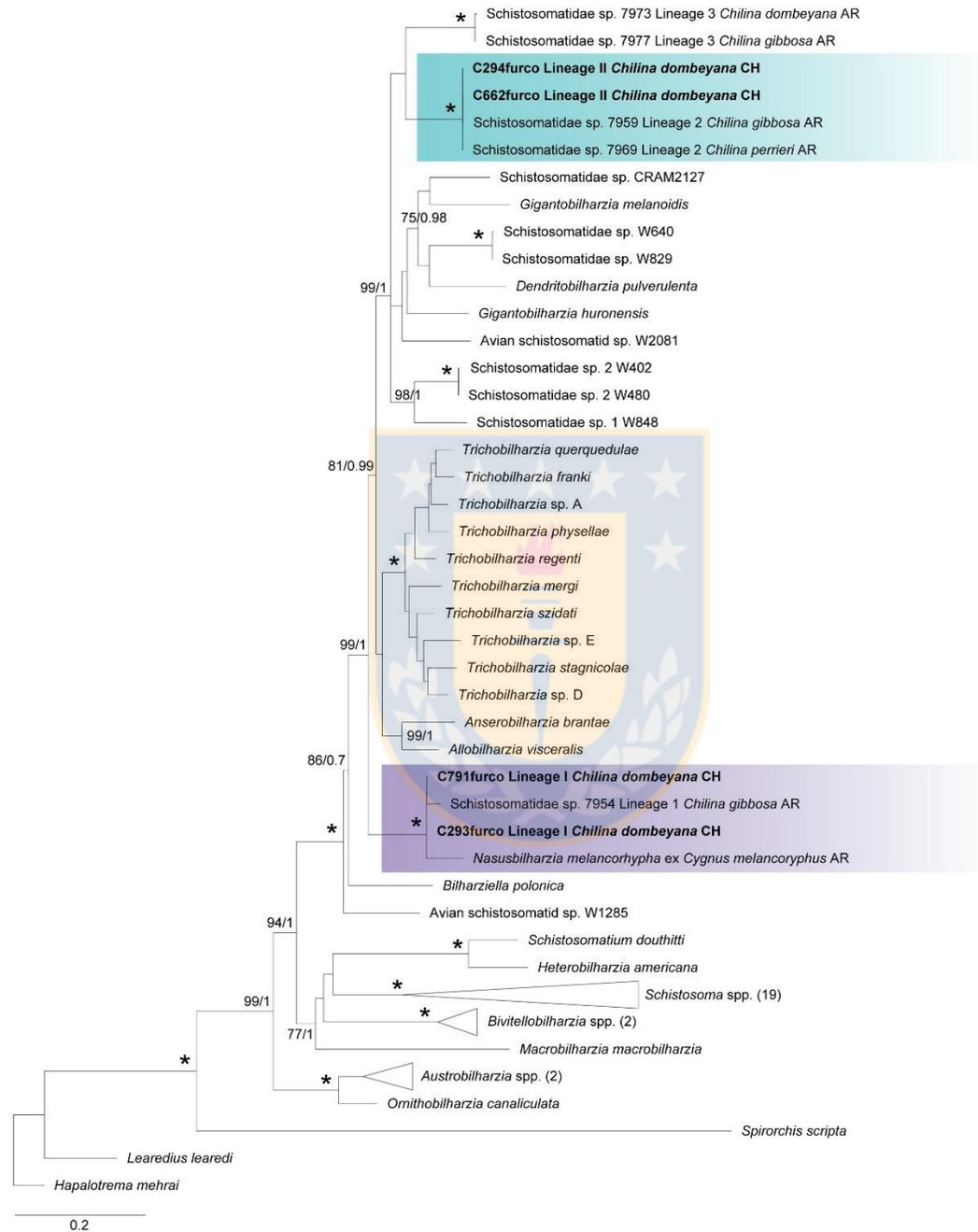


Figura 10. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para los genes 28S-COI concatenados. Esta filogenia fue inferida de un alineamiento de 2894 pb. Los modelos de sustitución calculados para MV e IB fueron GTR+F+I+G4 (nonCoding), TIM2+F+I+G4 (part1), GTR+F+I+G4 (part2), TIM2+F+I+G4 (part3), y M_{177} , M_{198} ,

*M*₁₉₅, *M*₂₀₃ (nonCoding), *M*₁₃₈, *M*₂₀₁, *M*₁₆₂, *M*₁₈₉, *M*₂₀₃, *M*₁₉₃, *M*₁₃₄ (part1), *M*₂₉, *M*₅₄, *M*₆₈, *M*₈₁, *M*₁₄₅, *M*₁₆₀ (part2), *M*₁₆₆, *M*₁₉₁, *M*₁₂₅, *M*₂₀₀, *M*₂₀₃ (part3), respectivamente. Los mejores modelos se eligieron usando el Criterio de Información Bayesiano (CIB). Los valores Bootstrap ≥ 70 (izquierda) y probabilidades posteriores ≥ 0.7 (derecha) se presentan en cada nodo. Un asterisco (*) indica soporte completo (100/1). Las secuencias generadas en el presente estudio se indican en negrita. Los grupos externos (“outgroups”) con más de dos secuencias se colapsaron con el número de secuencias detalladas entre paréntesis.

No se pudieron realizar análisis moleculares al Linaje III aquí descrito debido al reducido número de cercarias y esporoquistes. Se realizó la extracción de ADN para estas muestras, aunque sin resultados satisfactorios.

Las distancias genéticas para cada gen entre las secuencias generadas en el presente estudio y aquellas de otros taxones cercanamente relacionados, según lo mencionado en los análisis filogenéticos, se pueden observar en las Tablas 5-6.



Tabla 5. Distancias genéticas para el gen COI entre los taxones del presente estudio y otros esquistosomas aviáres depositados en el GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
1 C293_lineage_I																													
2 C791_lineage_I	0.002																												
3 C294_lineage_II	0.194	0.197																											
4 C297_lineage_II	0.194	0.197	0.000																										
5 C662_lineage_II	0.197	0.199	0.002	0.002																									
6 C759_lineage_II	0.194	0.197	0.000	0.000	0.002																								
7 C762_lineage_II	0.197	0.199	0.002	0.002	0.000	0.002																							
8 C1069_lineage_II	0.194	0.197	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002																						
9 Schistosomatidae_sp_7954_lineage_1	0.065	0.062	0.165	0.165	0.168	0.165	0.168	0.165																					
10 <i>Nasubilharzia_melanconhypha</i>	0.139	0.141	0.194	0.194	0.197	0.194	0.197	0.194	0.163																				
11 Schistosomatidae_sp_7959_lineage_2	0.199	0.201	0.005	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.170	0.199																			
12 Schistosomatidae_sp_7969_lineage_2	0.194	0.197	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.165	0.194	0.005																		
13 Schistosomatidae_sp_7973_lineage_3	0.141	0.139	0.149	0.149	0.151	0.149	0.151	0.149	0.149	0.192	0.153	0.149																	
14 Schistosomatidae_sp_7977_lineage_3	0.146	0.144	0.151	0.151	0.149	0.151	0.149	0.151	0.153	0.197	0.151	0.151	0.010																
15 <i>Bilharziella_polonica</i>	0.177	0.175	0.216	0.216	0.218	0.216	0.218	0.216	0.177	0.206	0.216	0.216	0.209	0.213															
16 <i>Trichobilharzia_querquedulae</i>	0.163	0.165	0.182	0.182	0.185	0.182	0.185	0.182	0.168	0.177	0.187	0.182	0.156	0.161	0.189														
17 Schistosomatidae_sp_ex_Melanoides	0.206	0.204	0.211	0.211	0.213	0.211	0.213	0.211	0.211	0.233	0.216	0.211	0.173	0.175	0.235	0.185													
18 <i>Gigantobilharzia_huronensis</i>	0.187	0.189	0.187	0.187	0.189	0.187	0.189	0.187	0.192	0.199	0.189	0.187	0.189	0.192	0.223	0.194	0.211												
19 <i>Dendritobilharzia_pulverulenta</i>	0.187	0.189	0.230	0.230	0.233	0.230	0.233	0.230	0.199	0.221	0.235	0.230	0.201	0.204	0.204	0.194	0.223	0.237											
20 <i>Allobilharzia_visceralis</i>	0.165	0.168	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.165	0.218	0.165	0.163	0.161	0.158	0.189	0.165	0.216	0.189	0.194										
21 <i>Anserobilharzia_brantae</i>	0.168	0.165	0.204	0.204	0.206	0.204	0.206	0.204	0.173	0.206	0.206	0.204	0.153	0.156	0.185	0.149	0.175	0.199	0.192	0.151									
22 Schistosomatidae_sp_1_W848	0.153	0.156	0.177	0.177	0.180	0.177	0.180	0.177	0.161	0.173	0.182	0.177	0.161	0.163	0.192	0.153	0.209	0.170	0.216	0.168	0.165								
23 Schistosomatidae_sp_2_W402	0.177	0.180	0.163	0.163	0.165	0.163	0.165	0.163	0.177	0.170	0.168	0.163	0.177	0.180	0.192	0.163	0.218	0.194	0.221	0.165	0.189	0.141							
24 Schistosomatidae_sp_2_W480	0.177	0.180	0.165	0.165	0.168	0.165	0.168	0.165	0.177	0.170	0.170	0.165	0.180	0.182	0.192	0.163	0.221	0.194	0.221	0.165	0.189	0.141	0.002						
25 Schistosomatidae_sp_W640	0.201	0.204	0.216	0.216	0.218	0.216	0.218	0.216	0.216	0.225	0.218	0.216	0.204	0.204	0.218	0.213	0.199	0.201	0.206	0.221	0.194	0.201	0.218	0.218					
26 Schistosomatidae_sp_W829	0.199	0.201	0.216	0.216	0.218	0.216	0.218	0.216	0.213	0.223	0.218	0.216	0.204	0.204	0.216	0.211	0.199	0.199	0.204	0.218	0.192	0.199	0.218	0.218	0.002				
27 Avian_schistosomatid_sp_W2081	0.204	0.206	0.187	0.187	0.189	0.187	0.189	0.187	0.209	0.223	0.192	0.187	0.177	0.180	0.218	0.161	0.197	0.192	0.199	0.170	0.182	0.165	0.197	0.197	0.206	0.204			
28 Avian_schistosomatid_sp_W1285	0.185	0.187	0.213	0.213	0.216	0.213	0.216	0.213	0.201	0.201	0.218	0.213	0.175	0.177	0.197	0.156	0.201	0.211	0.201	0.156	0.173	0.187	0.173	0.173	0.204	0.201	0.192		

Tabla 6. Distancias genéticas para el gen 28S entre los taxones del presente estudio y otros esquistosomas aviare depositados en el GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1 C293_lineage_I																														
2 C297_lineage_I	0.000																													
3 C791_lineage_I	0.000	0.000																												
4 C280_lineage_II	0.045	0.045	0.045																											
5 C282_lineage_II	0.047	0.047	0.047	0.001																										
6 C294_lineage_II	0.045	0.045	0.045	0.000	0.001																									
7 C303_lineage_II	0.045	0.045	0.045	0.000	0.001	0.000																								
8 C662_lineage_II	0.045	0.045	0.045	0.000	0.001	0.000	0.000																							
9 C762_lineage_II	0.045	0.045	0.045	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000																						
10 C1069_lineage_II	0.045	0.045	0.045	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000																					
11 Schistosomatidae_sp_7954_lineage_1	0.000	0.000	0.000	0.045	0.047	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045
12 <i>Nasutobilharzia_melancorhypha</i>	0.000	0.000	0.000	0.045	0.047	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045
13 Schistosomatidae_sp_7959_lineage_2	0.047	0.047	0.047	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
14 Schistosomatidae_sp_7969_lineage_2	0.045	0.045	0.045	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15 Schistosomatidae_sp_7973_lineage_3	0.065	0.065	0.065	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044
16 Schistosomatidae_sp_7977_lineage_3	0.064	0.064	0.064	0.043	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043
17 <i>Bilharziella_polonica</i>	0.052	0.052	0.052	0.057	0.059	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057
18 <i>Trichobilharzia_querquedulae</i>	0.036	0.036	0.036	0.023	0.024	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023
19 <i>Gigantobilharzia_huronensis</i>	0.048	0.048	0.048	0.029	0.031	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029
20 Schistosomatidae_sp_ex_Melanoides	0.057	0.057	0.057	0.041	0.043	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041
21 <i>Dendrobilharzia_pulverulenta</i>	0.045	0.045	0.045	0.029	0.031	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029
22 <i>Allobilharzia_visceralis</i>	0.044	0.044	0.044	0.036	0.037	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036
23 <i>Anserobilharzia_brantae</i>	0.055	0.055	0.055	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044
24 Schistosomatidae_sp_1_W848	0.061	0.061	0.061	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044
25 Schistosomatidae_sp_2_W402	0.055	0.055	0.055	0.039	0.040	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
26 Schistosomatidae_sp_2_W480	0.055	0.055	0.055	0.039	0.040	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
27 Schistosomatidae_sp_W640	0.052	0.052	0.052	0.031	0.032	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
28 Schistosomatidae_sp_W829	0.052	0.052	0.052	0.031	0.032	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
29 Avian_schistosomatid_sp_W1285	0.068	0.068	0.068	0.064	0.065	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064
30 Avian_schistosomatid_sp_W2081	0.053	0.053	0.053	0.039	0.040	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039

4.5. Relación entre longitud de concha y parasitismo y especificidad

El rango de longitud de la concha de los caracoles *C. dombeyana* medidos, considerando parasitados y no parasitados, varió de 1,96 hasta 29,47 mm (n= 354 caracoles). De estos, los caracoles que se encontraron parasitados, i.e. presencia de furcocercarias/esporoquistes, presentaron una longitud mínima de 12.13 mm. El caracol que presentó la mayor liberación cercarial, 908 furcocercarias, midió 23.57 mm, mientras que el que presentó la menor liberación cercarial, 1 furcocercaria, midió 22,03 mm, no obstante, algunos caracoles de menor talla presentaron una elevada liberación cercarial, e.g. 14,01 mm de largo de concha con 177 furcocercarias liberadas. El caracol de menor longitud que resultó parasitado sólo presentó esporoquistes en sus tejidos, sin liberación cercarial. Respecto al análisis estadístico se observó una asociación positiva significativa entre la longitud de la concha y la presencia de furcocercarias en los caracoles ($p < 0,05$) (Tabla 7), como también se observó asociación positiva significativa respecto a la abundancia de furcocercarias en éstos ($p < 0,05$) (Tabla 8).

No se consideraron dentro de los análisis estadísticos la localidad ni la especie de molusco parasitado, ya que sólo se obtuvo una variable para cada uno: una especie de caracol parasitado proveniente de una sola localidad.

Respecto a la especificidad de los esquistosomas aquí aislados, y teniendo en consideración que los tres linajes se registraron desde una única especie de molusco, se plantea que el nivel de especificidad de cada uno, según el índice S_{TD} , fue de 1, indicando una alta especificidad.

Tabla 7. Análisis de Regresión logística simple considerando como variables la longitud de la concha de los caracoles y presencia de furcocercarias.

	Número de obs	= 354				
	LR chi2(3)	= 42,77				
	Prob > chi2	= 0,0000				
Logaritmo de verosimilitud = -83,711256						
schistos	Odds ratio	Error estándar	z	P> z	[Intervalo de confianza 95%]	
largoconcha	1,306804	0,068139	5,13	0,000	1,179851	1,447417
_cons	0,0006887	0,0007572	-6,62	0,000	0,0000798	0,0059416

Tabla 8. Análisis estadístico de Regresión binomial negativa simple considerando como variables la longitud de la concha y la abundancia de furcocercarias.

Dispersión: media						Número de obs	= 354
Logaritmo de verosimilitud = -226,96666						LR chi2(14)	= 19,03
						Prob > chi2	= 0,0000

nfurcocercarias	Coeficiente	Error estándar	z	P> z	[Intervalo de confianza 95%]		

largoconcha	0,4599843	0,1059981	4,34	0,000	0,2522319	0,6677368	
_cons	-6,723537	1,71723	-3,92	0,000	-10,08925	-3,357828	

prueba de razón de verosimilitud (LR) de alfa=0: chibar2(01) = 1,7e+04						Prob >= chibar2 = 0,000	

4.6. Ecosistema de los caracoles parasitados

Todos los caracoles parasitados con esquistosomas aviares provinieron de la Laguna Chica de San Pedro, en la localidad de San Pedro de La Paz, región del Biobío. Los ejemplares de *Chilina* parasitados fueron colectadas desde una zona alejada de cualquier actividad recreacional humana, la cual se caracterizó por una alta presencia de material vegetal acuático, troncos en descomposición y actividad anaeróbica en el fondo de dicha zona. Los caracoles fueron colectados debajo de troncos, adheridos a las rocas o sobre el basural presente en el borde de dicha zona. Además, en primavera y verano, se observó un aumento evidente de huevos adheridos a los mismos sustratos antes mencionados a medida que avanzaban los meses, para ya a finales de marzo y mediados de abril el número de dichos caracoles cayó dramáticamente, siendo muy difícil encontrar algún ejemplar.

Igualmente se muestrearon moluscos presentes en las zonas adyacentes al sitio destinado a los bañistas, sin embargo, el nivel de intervención humana es tal que los caracoles sólo se encontraron, y de forma muy escasa, a varios metros de distancia (~200 metros) del área principal de actividad, probablemente debido a la ausencia de vegetación acuática en esas zonas. Dentro de las aves habitualmente observadas en la Laguna Chica de San Pedro, se pueden mencionar a la tagua común (Gruiformes: *Fulica armillata* Vieillot, 1817), cisne de cuello negro (Anseriformes: *C. melancoryphus*), huala (Podicipediformes: *Podiceps major* (Boddaert, 1783)), picurio (Podicipediformes: *Podilymbus podiceps* (Linnaeus, 1758)),

cormorán yeco (Suliformes: *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789)), garza grande (Pelecaniformes: *Ardea alba* Linnaeus, 1758), Chucao (Passeriformes: *Scelorchilus rubecola* (Kittlitz, 1830)) y sietecolores (Passeriformes: *Tachuris rubrigastra* (Vieillot, 1817)). De todas estas aves, se observaron al cisne de cuello negro y a la tagua común anidando durante la primavera, y cuidando y alimentando a sus polluelos durante el verano, en el borde de la laguna donde los caracoles fueron colectados.



5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten aceptar la hipótesis de caracoles Chiliniidae como los principales hospederos intermediarios de esquistosomas aviares en las zonas centro y sur de Chile. Este estudio es el primero en describir tanto morfológica- como molecularmente los esquistosomas aviares presentes en Chile, incluyendo su comportamiento cercarial. Tres diferentes linajes de esquistosomas aviares se registraron en *C. dombeyana*, cada uno distinto del otro en su morfología, morfometría y soportado por datos moleculares. Todos los caracoles infectados provinieron del mismo sitio, Laguna Chica de San Pedro, donde Valdovinos y Balboa (2008) reportaron un brote de sarpullido del nadador. Este brote se asoció al taxón *Trichobilharzia* sp., sin embargo, éste no fue descrito adecuadamente, no incluyendo todas las mediciones ni una caracterización molecular, los cuales son requeridos para determinar la identidad de las furcocercarias (Brant *et al.* 2006, Brant y Loker 2009a, b; Horák *et al.* 2012; Helmer *et al.* 2021).

Las características morfométricas de los Linajes I y II estuvieron en completa conformidad con aquellos de los linajes 1 y 2 de Argentina, respectivamente. Mientras tanto, el Linaje III fue el más pequeño en comparación con todas las furcocercarias aisladas desde caracoles del género *Chilina* en Argentina por Szidat (1951), Martorelli (1984) y Flores *et al.* (2015). No obstante, ciertas mediciones como el diámetro del acetábulo, longitud del primordio genital y las proporciones entre la longitud del cuerpo, tallo de la cola y furcas, fueron similares a los Linajes II y 2 (ver Tabla 4).

Las furcocercarias del Linaje I y aquellas del linaje 1 de Argentina compartieron algunos rasgos morfológicos con *Cercaria chilinicola* descrito por Martorelli (1984), tales como la musculatura bien desarrollada en la base del órgano de penetración, el cual no se observó en los demás linajes. Sin embargo, las cercarias de Martorelli (1984) difirieron respecto al Linaje I porque estas cercarias se describieron como completamente cubiertas de espinas pequeñas, lo cual no se observó en el Linaje I. Además, las medidas de la longitud del cuerpo, tallo de la cola, furcas, y las proporciones entre estas estructuras fueron diferentes entre estos taxones. Flores *et al.* (2015) sugirió que el linaje 2 y *C. chilinicola* corresponderían al mismo taxón porque comparten varios rasgos morfológicos y morfométricos. Una situación similar se observó con nuestras furcocercarias del Linaje II, sin embargo, hay algunas diferencias morfológicas como las nombradas a continuación: ocelos de *C. chilinicola* están en el primer

tercio del cuerpo en comparación con el resto de los esquistosomas asociados a *Chilina*, incluyendo nuestras muestras, las cuales están en el segundo tercio del cuerpo. Además, los esporoquistes de *C. chilinicola* fueron diferentes respecto al Linaje II y III, dado que el primero es redondeado en un extremo y con dos puntas también redondeadas en el otro extremo, mientras que los esporoquistes de los linajes aislados son redondeados con una única punta en cada extremo.

En el caso de *Cercaria chilinae I* descrita por Szidat (1951), la longitud total y del cuerpo y la proporción de la longitud corporal:longitud de furcas estuvieron dentro de los rangos observados en el Linaje II, aunque la longitud del tallo de la cola fue ligeramente mayor y la proporción de la longitud corporal:longitud del tallo de la cola fue ligeramente menor. Acorde a Ostrowski de Núñez (1992), *C. chilinae I* and *II* probablemente corresponden al mismo taxón, esto debido a que las diferencias observadas fueron insignificantes. Nosotros coincidimos con dicha sugerencia, porque las medidas para ambos esquistosomas (ver Tabla 4; Szidat 1951) están incluidas en el rango de medidas para el Linaje II del presente estudio, excepto por la longitud del tallo de la cola y la longitud total que fueron ligeramente superiores. Estas diferencias morfométricas podrían estar relacionadas a la constricción de los vermes como consecuencia del uso de diferentes fijadores (etanol, formalina), temperatura ambiental, tamaño del hospedero o a su variabilidad morfométrica (Pinto *et al.* 2017; Helmer *et al.* 2021). Szidat (1951) no especificó el medio de fijación de los vermes, no obstante, en el presente estudio estos fueron muertos y fijados utilizando etanol 96%, siguiendo lo indicado por Brant y Loker (2009a).

La organización de las glándulas de penetración fue la misma para los tres linajes aquí reportados, no obstante, estos difirieron respecto a los linajes descritos en Argentina por Flores *et al.* (2015). Acorde a estos autores, el linaje 2 posee dos pares de glándulas preacetabulares y otros tres postacetabulares. Mientras tanto para el linaje 3, hay dos pares anteriores, dos pares al nivel del acetábulo, y un par posterior a éste. Además, *C. chilinicola* tiene dos pares de glándulas preacetabulares, y los otros tres pares son postacetabulares (Martorelli 1984). Sin embargo, los vermes del presente estudio tienen solo dos pares de glándulas preacetabulares, un par paracetabular y dos pares postacetabulares. Esta organización se estableció en cercarias vivas teñidas con la tinción Rojo Neutral, situación que no fue detallada por los autores mencionados arriba. La fórmula protonefridial del linaje

1 descrito por Flores *et al.* (2015) no se había detallado hasta ahora, así, el presente estudio lo menciona por primera vez. Mientras tanto, para el Linaje II fue diferente en comparación con el linaje 2 de Argentina; acorde a Flores *et al.* (2015) hay 12 células flama, sin embargo, en el presente linaje se observaron un par de pequeñas células flama ubicadas anterior a los ocelos y caudal a la glándula de penetración, dando un total de 14 células flama, con 6 pares de células flama en el cuerpo en vez de 5 pares de células flama. Tanto la organización de las glándulas de penetración y la fórmula protonefridial del Linaje II corresponde con las descripciones de *C. chilinae I y II* en *Chilina fluminea* (Maton, 1811) de Argentina (Szidat 1951). En consecuencia, y a pesar de las pequeñas diferencias en los datos morfométricos, los resultados sugieren que estos probablemente pertenecen a la misma especie.

Una estructura caudal al acetábulo a distancia variable, según el linaje y compuesta por múltiples células pequeñas fue visible sólo en las furcocercarias teñidas con Alum Carmín. Martorelli (1984) sugirió que esta podría corresponder al primordio genital. Este conglomerado de células no ha sido mencionado para ningún esquistosoma aviar aislado desde caracoles chilinos (ver Szidat 1951; Flores *et al.* 2015), excepto para *C. chilinicola* (Martorelli 1984). Su posición variable denota un rasgo que podría ser considerado de importancia taxonómica, no obstante, su presencia y ubicación debería establecerse en el resto de los taxones.

Las imágenes MEB permitieron informar rasgos morfológicos que eran desconocidos para estos esquistosomas, como la distribución y tamaño de las espinas sobre el cuerpo, acetábulo, tallo de la cola y furcas, además de la presencia de una red asemejando un panal sobre la superficie del tallo de la cola para los Linajes I y II. En lo que a nosotros concierne, ninguna de estas particularidades del tegumento ha sido mencionados antes para ninguna cercaria de esquistosoma aviar en el Neotrópico. En consecuencia, estos hallazgos denotan la importancia del MEB en la caracterización del tegumento de las furcocercarias. Estudios adicionales establecerán si estos rasgos son exclusivos para los esquistosomas parasitando especies de *Chilina* o si son compartidos con taxones no relacionados. Por otro lado, y en relación con las espinas tegumentales, hay un conflicto respecto a la descripción de Szidat (1951) quién estableció que el cuerpo de *C. chilinae I* era liso excepto en el área del órgano cefálico. Sin embargo, para los linajes aquí reportados, y para el resto de los taxones de Argentina, hay claramente espinas pequeñas distribuidas sobre el cuerpo, aunque es cierto

que estas están más densamente agrupadas sobre el órgano mencionado arriba. Considerando la sinonimia previamente propuesta para esta cercaria con el Linaje II, es necesario revisar el material descrito por este autor o material colectado en la localidad tipo.

En relación con el taxón reportado por Valdovinos y Balboa (2008), la longitud total mencionada está incluida dentro de los tres linajes aquí descritos, con el Linaje III como la furcocercaria más pequeña, el Linaje I como el más grande, y el Linaje II con valores entre las dos mencionadas. Aunque estos autores realizaron observaciones al MEB, ninguno de los rasgos aquí reportados fue descrito en dicho estudio.

La descripción del comportamiento cercarial es importante para la caracterización de los taxones en el proceso de identificación de trematodos (Ostrowski de Núñez 1992; Horák *et al.* 2015). Así, este estudio describe por primera vez el comportamiento y respuesta a diferentes estímulos de estos esquistosomas compartidos con Argentina, excepto para el Linaje III. Szidat (1951) y Martorelli (1984) describieron que *C. chilinae I y II*, y *C. chilinicola*, respectivamente, eran positivamente fototácticos y que después de nadar, descansaban adheridos a la pared del frasco que contenía los caracoles o en la superficie del agua con la cola en un ángulo de 90°. Las furcocercarias aquí descritas mostraron un comportamiento similar, sin embargo, el ángulo de la cola fue inferior con un ángulo máximo de 45° en relación con el cuerpo. La sobrevida de las furcocercarias fue de aproximadamente 24 h, tal como Szidat (1951) reportó, aunque Martorelli (1984) registró una sobrevida mayor con 32-36 h. Este último autor indicó una temperatura del agua 20°C, mientras que en el presente estudio, aunque no se midió dicha temperatura en los pocillos, sí se estableció una temperatura ambiental similar. Dicha temperatura podría influir en la sobrevida de las cercarias, tal como Żbikowska (2004) sugirió, estableciendo una temperatura óptima de 8°C para la sobrevida de furcocercarias de *Trichobilharzia ocellata* (La Valette St. George, 1855) Brumpt, 1931 y *B. polonica*, ambos taxones europeos, los cuales fueron capaces de sobrevivir hasta 130 h. En contraste, temperaturas de 20°C redujeron la sobrevida de las furcocercarias a 70 h. Futuros estudios deberán establecer si existe una temperatura óptima para las furcocercarias de esquistosomas neotropicales.

La caracterización molecular ha probado ser una excelente herramienta para la identificación de las especies de esquistosomas, particularmente para las etapas larvales, permitiendo unir diferentes estadios del ciclo de vida sin la necesidad de estudios

experimentales los cuales llevan mucho tiempo y son difíciles de lograr (Horák *et al.* 2012, 2015; Pinto *et al.* 2017). En el presente estudio, dos linajes se alinearon con otros esquistosomas previamente registrados parasitando a *Chilina* spp. de Argentina (Flores *et al.* 2015), soportando la delimitación morfológica de las furcocercarias aisladas. Además, uno de los linajes, Linaje I, se alineó con un esquistosoma aviar recientemente descrito en el cisne de cuello negro de Argentina, *N. melancorhypha* (Flores *et al.* 2021), expandiendo así su distribución geográfica a Chile, donde este cisne está ampliamente distribuido (Martínez y González 2017). Por lo tanto, sería esperable encontrar este esquistosoma en futuros estudios parasitológicos de aves acuáticas. Aunque el Linaje III no pudo ser molecularmente caracterizado, correspondería a un taxón no descrito, al menos desde el punto de vista morfológico. Dicho lo anterior, y considerando los registros previos de Szidat (1951), Martorelli (1984), Flores *et al.* (2015, 2021), junto a los resultados aquí mencionados, un total de cinco linajes diferentes de esquistosomas aviares estarían parasitando el género *Chilina*, i.e. Linaje I/1, Linaje II/2, Linaje III, Linaje 3 y *C. chilinicola*, con cuatro de ellos pendientes de ser descritos al nivel específico. Sin embargo, la caracterización molecular del Linaje III y *C. chilinicola* permanece pendiente.

Para el árbol de 28S y el árbol concatenado de 28S-COI, los Linajes II/2 y 3 conformaron un clado común, con un alto soporte nodal, junto a *Dendritobilharzia* Skrjabin y Zakharov, 1920, *Gigantobilharzia* Odhner, 1910 y otros taxones no descritos de esquistosomas aviares de ecosistemas dulceacuícolas como marinos transmitidos por gasterópodos no relacionados, e.g. planórbidos y siphonáridos, con algunos de ellos causando brotes ocasionales de dermatitis cercarial a una escala local (e.g. Brant *et al.* 2010; Pinto *et al.* 2017), contrastando con las especies de *Trichobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920 que son responsables de la mayoría de los brotes a una escala global (Horák *et al.* 2015). Además, Linaje I/1 se ubicó en una posición basal a casi todos los taxones del clado DAS, incluyendo los Linajes II/2 y 3, con un alto soporte nodal como Flores *et al.* (2015) también sugirió. Flores *et al.* (2015) hipotetiza que dicha posición filogenética basal plantea a estos esquistosomas transmitidos por *Chilina* como taxones claves en el origen de los esquistosomas aviares en el continente americano. No obstante, para soportar mejor este supuesto aún faltan más información respecto a la filogenia de estos parásitos, particularmente aquellos provenientes del continente Sudamericano.

En contraste, el árbol de COI mostró a los tres linajes de *Chilina* en un clado común con otros taxones no descritos, aunque con un soporte moderado, mientras que el clado incluyendo a *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia* y otros esquistosomas aviáres no descritos fueron basales al resto del clado DAS. Este árbol del gen COI tuvo una topología similar a la de Flores *et al.* (2021) para el esquistosoma aviar *N. melancorhypha*.

Hasta ahora, la identidad específica de los linajes 2 y 3 de Argentina, y el Linaje II de este estudio, no ha sido establecida. Considerando su posición en los árboles filogenéticos para ambos genes, y las distancias genéticas entre los presentes linajes y otros géneros de esquistosomas aviáres, estos corresponderían a diferentes especies o incluso géneros distintos, tal como Flores *et al.* (2021) recientemente confirman con la descripción del nuevo género *Nasusbilharzia*. En consecuencia, diferentes especies aviáres, no necesariamente relacionadas al cisne de cuello negro, albergarían a los vermes adultos de estos taxones. Además, otras especies aviáres simpátricas de diferentes órdenes, y habitando el mismo lugar de donde se colectaron los caracoles parasitados, podrían representar hospederos definitivos potenciales para estos esquistosomas, e.g. taguas (Gruiformes), cormoranes (Suliformes), garzas (Pelecaniformes) y zambullidores (Podicipediformes). Es interesante mencionar que todos estos órdenes de aves han sido reportados como hospederos de esquistosomas aviáres en otras partes del mundo (Horák *et al.* 2015). Aunque algunas de estas aves han sido estudiadas desde el punto de vista parasitológico en Chile (ver Oyarzún-Ruiz y González-Acuña 2022), todos estos estudios se han enfocado principalmente en los parásitos gastrointestinales, por lo cual la presencia de esquistosomas probablemente se encuentre subestimada.

Se registró una co-infección en tres caracoles colectados durante noviembre 2019 entre las cercarias de los Linajes I y II. La intensidad total de infección varió de 16 a 85 furcocercarias en estos caracoles, con sólo una pequeña parte de estas cercarias perteneciendo al Linaje I (85 vs 7, 57 vs 1, y 16 vs 1 cercarias). Así, se establece una evidente predominancia del Linaje II, lo cual también se aplicó para el resto de los *Chilina* parasitados, con el Linaje II como el taxón más prevalente. Aunque hay ejemplos de co-infección entre esquistosomas aviáres y otros trematodos como estrigeidos (Strigeidae), heterófidios (Heterophyidae) y equinostomas (Echinostomatidae) (Lie 1973; Walker 1979; Soldánová *et al.* 2013), a nuestro conocimiento, la co-ocurrencia de esquistosomas aviáres en el mismo caracol hospedero no

ha sido documentado en la literatura. Este hallazgo podría ser atribuido a una inmunosupresión de los caracoles o que ambos esquistosomas son capaces de cohabitar en el mismo hospedero (Walker 1979). Además, un grado de competencia entre ambos linajes podría ser sugerido, lo cual acorde a Lie (1973), debiera ser considerado como un antagonismo indirecto entre los esporoquistes, donde el taxón dominante causa un desarrollo retrasado en el taxón subordinado, con una marcada reducción o ausencia del último dentro del caracol. No obstante, en este caso, la liberación de furcocercarias ocurrió para ambos linajes, aunque en números reducidos para uno de ellos, sugiriendo la presencia de un taxón dominante (Linaje II) y uno subordinado (Linaje I). Así, y siguiendo las definiciones de Lie (1973), esto debería catalogarse como un antagonismo indirecto débil porque no hay una reducción absoluta en la salida larval del taxón subordinado. Sin prejuicio de lo anterior, incluso para el linaje dominante se registró una reducida liberación cercarial, lo cual se confirmó después a través de la disección de estos caracoles, con un número reducido de esporoquistes, sugiriendo una infección temprana. Por lo tanto, y para entender mejor los mecanismos subyacentes que causan tal interacción, estudios experimentales son requeridos.

Se observó una asociación positiva y significativa de la longitud de la concha respecto a la liberación cercarial como con la abundancia de estas últimas. En otras palabras, la posibilidad de encontrar un caracol parasitado y que esté liberando una mayor cantidad de furcocercarias en la columna de agua es mayor a medida que el caracol sea de mayor longitud. La misma asociación se ha reportado previamente en *C. dombeyana* pero en asociación a otros trematodos larvales (Olmos y George-Nascimento 1997). Las posibles explicaciones de esto pueden reducirse a dos; primero relacionado a la ontogenia de los moluscos, con los caracoles de mayor longitud de concha siendo aquellos individuos de mayor edad en comparación a los pequeños, que sería individuos juveniles (Olmos y George-Nascimento 1997). Si bien la biología específica de este molusco no es conocida en detalle (Fuentelba *et al.* 2010), en general, se plantea que los caracoles viven por 1 año, por lo que los individuos parasitados de mayor tamaño, hasta 3 cm de largo, podrían corresponder a especímenes de la temporada anterior, lo cual les da un mayor tiempo de exposición a diversos parásitos, en este caso a los miracidios que estén siendo liberados por las aves (Cort *et al.* 1940; Sorensen y Minchella 2001). Y segundo, el gigantismo, el cual es un aumento del tamaño del hospedero inducido de forma indirecta por ciertos parásitos, para garantizar una mayor fuente

de recursos, i.e. más tejido del caracol hospedero, para su desarrollo. Este gigantismo ocurre como consecuencia de la castración ejercida por el mismo parásito, dejando energía adicional al hospedero para crecer (Olmos y George-Nascimento 1997; Sorensen y Minchella 2001; Seppälä *et al.* 2013). Existen varios estudios reportando esto en los esquistosomas, aunque la mayoría se han enfocado en el esquistosoma humano *Schistosoma mansoni* Sambo, 1907 y su caracol hospedero *Biomphalaria* spp. (Planorbidae). No obstante, hay un ejemplo para los esquistosomas aviáres, a través del parasitismo de *T. ocellata* en *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (Lymnaeidae) (Sorensen y Minchella 2001). Para comprender mejor la naturaleza de esta asociación entre el parasitismo y el tamaño de este caracol se requieren estudios experimentales (Sorensen y Minchella 2001) para cada linaje y así establecer si todos tienen un efecto similar o incluso si difieren.

El valor S_{TD} de Poulin y Moulliot fue de 1, lo cual significa que cada uno de los linajes es altamente específico para *C. dombeyana* (Poulin 2007), esto de forma preliminar hasta que se realicen mayor investigación en otras especies de este género en el país. Ya que acorde a los estudios previos de Martorelli (1984), Szidat (1951) y Flores *et al.* (2015), otras especies de *Chilina* son capaces de albergar esquistosomas aviáres, e.g. *C. fluminea* y *Chilina gibbosa* Sowerby, 1838, las cuales también están distribuidas en Chile (Valdovinos 2006). Así, futuras investigaciones debieran considerar muestrear estas y otras especies para evaluar si son capaces de albergar a los mismos linajes aquí reportados u otros aun sin describir. Si bien el género *Chilina* está restringido al Neotrópico, son contados los esfuerzos respecto a la sistemática de estos caracoles (Flores *et al.* 2015; Bórquez *et al.* 2020), lo cual es particularmente importante considerando que hay 30 especies descritas morfológicamente en Chile, con la mayoría de ellas concentradas en el Centro y Sur de Chile (Valdovinos 2006; Fuentealba *et al.* 2010). En lo sucesivo, una caracterización molecular de estos hospederos intermediarios permitiría establecer, por ejemplo, el grado de especificidad de los esquistosomas aviáres dentro de la familia Chiliniidae con mayor exactitud.

Physella acuta es un caracol norteamericano que es capaz de tolerar marcados cambios en la composición abiótica de los ambientes acuáticos, ventaja que les permite ser una especie invasora exitosa a una escala global, incluyendo Chile (Fuentealba *et al.* 2010; Collado 2017). Además, esta especie de molusco actúa como hospedero intermediario de esquistosomas aviáres zoonóticos en Norteamérica, como por ejemplo *Trichobilharzia*

physellae (Talbot, 1936) McMullen y Beaver, 1945 y *Trichobilharzia querquedulae* McLeod, 1937 (Brant y Loker 2009a, b), y recientemente fuera de su distribución natural, en Europa (Helmer *et al.* 2021). Considerando las prevalencias reducidas asociadas a estos parásitos (e.g. Brant y Loker 2009b; Horák y Kolářová 2011; Marszewska *et al.* 2016; Al-Jubury *et al.* 2021), la ausencia de parasitismo por esquistosomas en el resto de las especies de caracoles aquí muestreados, e.g. *P. acuta*, podría relacionarse al pequeño tamaño muestral por área, por especie de caracol en algunos casos, o incluso podría ser un resultado esperado. No obstante, *P. acuta* resultó negativa a pesar de su mayor tamaño muestral en comparación con *C. dombeyana*; 1390 vs 714 caracoles, respectivamente. Esto podría estar relacionado a otros factores bióticos como la presencia de densas poblaciones de hospederos definitivos en el área muestreada, e.g. áreas de crianza de las aves (Ebbs *et al.* 2016; Helmer *et al.* 2021), o que este caracol physido requiere de aves acuáticas migratorias como fuente de infección (Pinto *et al.* 2014).

El anélido *Chaetogaster* sp. fue identificado en una pequeña proporción no superior al 4% en tres de las especies de caracoles aquí muestreados; *C. dombeyana*, *P. acuta* y *Potamolithus* sp. Este ectosimbionte ha sido catalogado como un importante controlador del parasitismo en los moluscos dulceacuícolas a los cuales está asociado, depredando sobre los miracidios que intentan parasitar a los caracoles como las cercarias que estos liberan (Ibrahim *et al.* 2007; Soldánová *et al.* 2013; Giannelli *et al.* 2016). En un estudio publicado por Ibrahim *et al.* (2007) se encontró una correlación negativa entre la prevalencia de *Chaetogaster limnaei* von Baer, 1827 y el parasitismo por trematodos en el caracol hospedero, sugiriendo un rol protector de este anélido. No obstante, en el presente estudio, se encontraron estos anélidos en 9 de 35 caracoles que sí resultaron parasitados con esquistosomas aviares. Si bien su presencia podría considerarse como un factor biótico interesante en la ecología de estas furcocercarias (Soldánová *et al.* 2013; Horák *et al.* 2015; Giannelli *et al.* 2016), se requieren condiciones controladas para evaluar el impacto que podrían tener sobre estas una vez han abandonado al caracol.

Durante el período de muestreo no hubo reportes de dermatitis cercarial, lo cual podría explicarse debido a la distancia importante entre el sitio de las actividades recreacionales acuáticas y el borde de la laguna donde se colectaron los caracoles parasitados, aproximadamente 800 m de distancia. A pesar de lo anterior, Cort *et al.* (1940), Szidat (1958)

and Skrabulis *et al.* (2020) han reportado que las furcocercarias pueden ser transportadas por corrientes acuáticas a distancias relativamente largas, de costa a costa, causando la afección cutánea lejos del lugar donde los caracoles parasitados están ubicados. Así, el riesgo de dermatitis cercarial no debe descartarse a pesar de la ausencia de caracoles parasitados en el área inmediata de las actividades acuáticas recreacionales. Además, acorde a los salvavidas de la Laguna Chica de San Pedro, cada verano algunos bañistas aparecen con erupciones cutáneas luego de bañarse, aunque ellos lo asocian a otras causas como bacterias o toxinas (Oyarzún-Ruiz, P. *Datos no publicados*). Esto podría considerarse evidencia de la actual transmisión de estos parásitos luego de 17 años desde el primer brote en dicha laguna (Valdovinos y Balboa 2008).

Otro punto pendiente para evaluar es el potencial zoonótico de los linajes aislados. Aunque Valdovinos y Balboa (2008) asociaron el brote en la mencionada laguna a *Trichobilharzia* sp., con los resultados discutidos es ahora sabido que este taxón corresponde a tres taxones distintos. Así, estudios experimentales son requeridos para establecer cuál de estos taxones podría causar el “sarpullido del nadador”, o incluso si todos estos son capaces de causar tal afección. El solo reporte de tres linajes diferentes representa un hallazgo importante, representando una advertencia para una potencial emergencia de una enfermedad parasitaria asociada a actividades humanas (Horák y Kolářová 2011; Pinto *et al.* 2017). Además, otro punto importante es que el Linaje I correspondió a un esquistosoma nasal, *N. melancorhypha*. Aunque no hay datos sobre el potencial zoonótico de la mencionada especie, este grupo de parásitos, con *Trichobilharzia regenti* Horák, Kolářová y Dvořák, 1998 como la especie modelo, son de preocupación porque en modelos murinos experimentales son capaces de migrar al sistema nervioso, causando severos cambios patológicos en los sistemas nervioso central y periférico de mamíferos como parálisis y disfunción motora, alteraciones que podrían extrapolarse a humanos (Horák y Kolářová 2001; Kolářová *et al.* 2001; Lichtenbergová *et al.* 2011; Marszewska *et al.* 2016).

Las probables implicancias del cambio climático sobre los parásitos han sido sugeridas mediante cambios en los hospederos y rango geográfico, desarrollo acelerado, y patogenicidad incrementada hacia los hospederos. En el caso de los trematodos, el incremento de la temperatura del agua aceleraría las tasas de desarrollo dentro de los caracoles hospederos causando la emergencia/re-emergencia de estos parásitos (Adlard *et al.*

2015). En consecuencia, para los esquistosomas zoonóticos esto se traduciría en una transmisión exacerbada hacia los seres humanos, causando brotes de dermatitis cercarial (Horák *et al.* 2015; Al-Jubury *et al.* 2021). El escenario climático actual es preocupante, destacando la necesidad de un mayor número de investigaciones relacionadas con la temprana identificación de esquistosomas potencialmente zoonóticos en áreas no estudiadas como ocurre en Sudamérica. Adicionalmente, la alteración de los ecosistemas relacionado a actividades antrópicas como los cuerpos de agua artificiales y eutrofización juegan un rol adicional a esta emergencia de parasitosis (Valdovinos y Balboa 2008; Soldánová y Kostadinova 2011; Soldánová *et al.* 2013; Marszewska *et al.* 2016). Este proceso de contaminación promueve un crecimiento excesivo de la vegetación acuática la cual sirve de refugio y como sitios de alimentación de caracoles, con el consecutivo incremento de la población de moluscos (Horák y Kolářová 2011; Soldánová *et al.* 2013), tal como ocurre en Laguna Chica de San Pedro. Además, los ecosistemas modificados atraen invertebrados, como moluscos, y aves acuáticas, incrementando las posibilidades que los ciclos de vida de los parásitos, tal como los esquistosomas aviares, se desarrollen (Horák *et al.* 2015; Marszewska *et al.* 2016).

Futuros estudios con mayores tamaños muestrales para cada especie de caracol y considerando distribuciones geográficas más amplias podrían revelar la ocurrencia de un mayor número de taxones de esquistosomas aviares, incluso el descubrimiento de nuevas especies para la ciencia. En el Sur de Chile hay múltiples lagos, lagunas y humedales que albergan una rica biodiversidad de caracoles acuáticos (Fuentealba *et al.* 2010) y son usualmente usados para actividades recreacionales como balneario, buceo, kayaking, avistamiento de aves, entre otros; constituyendo así áreas de riesgo para brotes de dermatitis cercarial, siendo de interés para su investigación (Horák *et al.* 2015).

6. REFERENCIAS

- Adlard RD, Miller TL, Smit NJ (2015) The butterfly effect: Parasite diversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. *Trends Parasitol* 31:160–166. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.001>
- Al-Jubury A, Duan Y, Kania PW, *et al* (2021) Avian schistosome species in Danish freshwater lakes: relation to biotic and abiotic factors. *J Helminthol* 95:e22. <https://doi.org/10.1017/S0022149X21000122>
- Biese WA (1949) Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile Familia Ancyliidae. *Boletín del Mus Nac Hist Nat Chile* 24:217–239.
- Biese WA (1951) Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile IV parte. *Boletín del Mus Nac Hist Nat Chile* 25:115–137.
- Bórquez J, Valdovinos C, Brante A (2020) Genetic structure and diversity in the freshwater gastropod *Chilina dombeiana* in the Biobío River, Chile. *Conserv Genet* 21:1023–1036. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01308-z>
- Brant SV, Loker ES (2009a) Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *J Parasitol* 95:941–963. <https://doi.org/10.1645/GE-1870.1>
- Brant SV, Loker ES (2009b) Schistosomes in the southwest United States and their potential for causing cercarial dermatitis or “swimmer’s itch.” *J Helminthol* 83:191–198. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09308020>
- Brant SV, Morgan JAT, Mkoji GM, *et al* (2006) An approach to revealing blood fluke life cycles, taxonomy, and diversity: provision of key reference data including DNA sequence from single life cycle stages. *J Parasitol* 92:77–88. <https://doi.org/10.1645/GE-3515.1>
- Brant SV, Cohen AN, James D, *et al* (2010) Cercarial dermatitis transmitted by exotic marine snail. *Emerg Infect Dis* 16:1357–1365. <https://doi.org/10.3201/eid1609.091664>
- Brant SV, Loker ES, Casalins L, Flores V (2017) Phylogenetic Placement of a Schistosome from an Unusual Marine Snail Host, the False Limpet (*Siphonaria lessoni*) and Gulls (*Larus dominicanus*) from Argentina with a Brief Review of Marine Schistosomes from Snails. *J Parasitol* 103:75–82. <https://doi.org/10.1645/16-43>

- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83:575–583. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2307/3284227>
- Christiansen A, Olsen A, Buchmann K, et al (2016) Molecular diversity of avian schistosomes in Danish freshwater snails. *Parasitol Res* 115:1027–1037. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4830-3>
- Collado GA (2017) Unraveling cryptic invasion of a freshwater snail in Chile based on molecular and morphological data. *Biodivers Conserv* 26:567–578. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1255-y>
- Correa AC, Escobar JS, Noya O, et al (2011) Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeidae), vectors of fasciolosis. *Infect Genet Evol* 11:1978–1988. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.003>
- Cort WW (1936) Studies on schistosome dermatitis. IV. Further information on distribution in Canada and the United States. *Am J Epidemiol* 24:318–333. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118267>
- Cort WW, McMullen DB, Olivier L, Brackett S (1940) Studies on schistosome dermatitis. VII. Seasonal incidence of *Cercaria stagnicola* Talbot, 1936, in relation to the life cycle of its snail host, *Stagnicola emarginata angulata* (Sowebey). *Am J Epidemiol* 32:33–69. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118678>
- Dvořák J, Vaňáčová Š, Hampl V, et al (2002) Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology* 124:307–313. <https://doi.org/10.1017/S0031182001001238>
- Ebbs ET, Loker ES, Davis NE, et al (2016) Schistosomes with wings: how host phylogeny and ecology shape the global distribution of *Trichobilharzia querquedulae* (Schistosomatidae). *Int J Parasitol* 46:669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.04.009>
- Fernández MV, Hamann MI, Ostrowski de Núñez M (2013) Larval trematodes of *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in a ricefield in Corrientes Province, Argentina. *Rev Mex Biodivers* 84:756–764. <https://doi.org/10.7550/rmb.33748>
- Flores V, Brant SV, Loker ES (2015) Avian schistosomes from the South American endemic gastropod genus *Chilina* (Pulmonata: Chiliniidae), with a brief review of South

- American schistosome species. *J Parasitol* 101:565–576. <https://doi.org/10.1645/14-639>
- Flores V, Viozzi G, Casalins L, *et al* (2021) A new Schistosome (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal tissue of South America black-necked swans, *Cygnus melancoryphus* (Anatidae) and the endemic pulmonate snail *Chilina gibbosa*. *Zootaxa* 4948:404–418. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4948.3.5>
- Fuentealba C, Figueroa R, Morrone JJ (2010) Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Rev Chil Hist Nat* 83:289–298. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2010000200009>
- Giannelli A, Cantacessi C, Colella V, *et al* (2016) Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail–Parasite Interplay. *Trends Parasitol* 32:255–264. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.002>
- Helmer N, Blatterer H, Hörweg C, *et al* (2021) First Record of *Trichobilharzia physellae* (Talbot, 1936) in Europe, a Possible Causative Agent of Cercarial Dermatitis. *Pathogens* 10:1473. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111473>
- Horák P, Kolářová LE (2001) Bird schistosomes: Do they die in mammalian skin? *Trends Parasitol* 17:66–69. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01770-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01770-0)
- Horák P, Kolářová L, Adema CM (2002) Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Adv Parasitol* 52:155–233. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(02\)52012-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(02)52012-1)
- Horák P, Kolářová L (2011) Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshw Biol* 56:779–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02545.x>
- Horák P, Schets FM, Kolářová L, Brant SV (2012) *Trichobilharzia*. In: Liu D (ed) *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. Taylor and Francis, CRC Press, Boca Raton, USA, pp 455–465.
- Horák P, Mikeš L, Lichtenbergová L, *et al* (2015) Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clin Microbiol Rev* 28:165–190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-14>
- Huelsenbeck JP, Larget B, Alfaro ME (2004) Bayesian Phylogenetic Model Selection Using Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo. *Mol Biol Evol* 21:1123–1133. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh123>

- Huelsenbeck JP, Rannala B (2004) Frequentist Properties of Bayesian Posterior Probabilities of Phylogenetic Trees Under Simple and Complex Substitution Models. *Syst Biol* 53:904–913. <https://doi.org/10.1080/10635150490522629>
- Ibrahim MM (2007) Population dynamics of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in the field populations of freshwater snails and its implications as a potential regulator of trematode larvae community. *Parasitol Res* 101:25–33. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0436-0>
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, *et al* (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 14:587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S (2014) Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci* 6:81–85. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>
- Kolářová L, Horák P, Čada F (2001) Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates. *Parasitol Res* 87:644–650. <https://doi.org/10.1007/s004360100431>
- Kolářová L, Horák P, Skírnisson K (2010) Methodical approaches in the identification of areas with a potential risk of infection by bird schistosomes causing cercarial dermatitis. *J Helminthol* 84:327–35. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09990721>
- Kolářová L, Horák P, Skírnisson K, *et al* (2013) Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 45:63–74. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8334-y>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lashaki EK, Gholami S, Fakhar M, *et al* (2021) Association between human cercarial dermatitis (HCD) and the occurrence of *Trichobilharzia* in duck and snail in main

- wetlands from Mazandaran Province, northern Iran. *Parasite Epidemiol Control* 13:e00211. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00211>
- Lichtenbergová L, Lassmann H, Jones MK, *et al* (2011) *Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice. *Exp Parasitol* 128:328–335. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.006>
- Lie KJ (1973) Larval trematode antagonism: Principles and possible application as a control method. *Exp Parasitol* 33:343–349. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(73\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(73)90038-6)
- Lindblade KA (1998) The epidemiology of cercarial dermatitis and its association with limnological characteristics of a Northern Michigan Lake. *J Parasitol* 84:19–23. <https://doi.org/10.2307/3284521>
- Lockyer AE, Olson PD, Østergaard P, *et al* (2003) The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology* 126:203–224. <https://doi.org/10.1017/S0031182002002792>
- Lorenti E, Brant SV, Gilardoni C, *et al* (2022) Two new genera and species of avian schistosomes from Argentina with proposed recommendations and discussion of the polyphyletic genus *Gigantobilharzia* (Trematoda, Schistosomatidae). *Parasitology*. Aceptado. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000130>
- Lutz HL, Tkach VV, Weckstein JD (2017) Methods for Specimen-based Studies of Avian Symbionts. In: Webster MS (ed) *The Extended Specimen: Emerging Frontiers in Collections-based Ornithological Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 157–183.
- Macháček T, Turjanicová L, Bulantová J, *et al* (2018) Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics. *Parasitol Res* 117:3881–3895. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6095-0>
- Maddison WP, Maddison DR (2021) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70. <http://www.mesquiteproject.org>
- Marszewska A, Cichy A, Heese T, Żbikowska E (2016) The real threat of swimmers' itch in anthropogenic recreational water body of the Polish Lowland. *Parasitol Res* 115:3049–3056. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5060-z>
- Martínez D, González G (2017) *Aves De Chile: Guía de Campo y breve Historia Natural*. Editorial El Naturalista. Santiago, Chile.

- Martorelli SR (1984) Sobre una cercaria de la familia Schistosomatidae (Digenea) parásita de *Chilina gibbosa* Sowerby, 1841 en Lago Pellegrini, Provincia de Rio Negro, República Argentina. *Neotropica* 30:97–106.
- Martorelli SR (1989) Estudios parasitológicos en la albufera de Mar Chiquita, provincia de Buenos Aires, República Argentina II: Cercarias (Digenea) parásitas de *Heleobia conexa* (Mollusca: Hydrobiidae), pertenecientes a las familias Schistosomatidae, Haploporidae y Homalometrida. *Neotropica* 35:81–90.
- Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A (2013) Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Mol Biol Evol* 30:1188–1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol* 32:268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Olmos V, George-Nascimento M (1997) El gremio de larvas de Digenea en el caracol del sur de Chile *Chilina dombeyana*: ¿qué indica la tasa metabólica de los hospedadores parasitados? *Rev Chil Hist Nat* 70:109–118.
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, et al (2003) Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol* 33:733–755. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00049-3)
- Ostrowski de Núñez M (1978) Fauna de agua dulce de la República Argentina. VII. Cercarias de la familia Schistosomatidae (Trematoda, Digenea). *Rev del Mus Argentino Ciencias Nat “Bernardino Rivadavia” e Inst Investig las Ciencias Nat* 2:65–76.
- Ostrowski de Núñez M (1992) Trematoda. Familias Strigeidae, Diplostomidae, Clinostomidae, Schistosomatidae, Spirorchiidae y Bucephalidae. In: de Castellanos ZA (ed) *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina, volumen 9, fascículo 1*. p 55.
- Oyarzún-Ruiz P, Muñoz P, Paredes E, et al (2019) Gastrointestinal helminths and related histopathological lesions in black-necked swans *Cygnus melancoryphus* from the Carlos Anwandter Nature Sanctuary, Southern Chile. *Rev Bras Parasitol Vet* 28:613–624. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019063>
- Oyarzún-Ruiz P, González-Acuña DA (2022) Current knowledge of trematodes (Platyhelminthes: Digenea, Aspidogastrea) in Chile. *Rev Suisse Zool*. Aceptado.

- Paré JA, Black SR (1999) Schistosomiasis in a Collection of Captive Chilean Flamingos (*Phoenicopterus chilensis*). *J Avian Med Surg* 13:187–191.
- Pinto HA, Brant SV, de Melo AL (2014) *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as a natural intermediate host of *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae), a potential causative agent of avian cercarial dermatitis in Brazil. *Acta Trop* 138:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.002>
- Pinto HA, Pulido-Murillo EA, de Melo AL, Brant SV (2017) Putative new genera and species of avian schistosomes potentially involved in human cercarial dermatitis in the Americas, Europe and Africa. *Acta Trop* 176:415–420. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.016>
- Poulin R (2007) *Evolutionary Ecology of Parasites*, 2th edn. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, *et al* (2018) Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67:901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, *et al* (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol* 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Schell SC (1985) *Handbook of Trematodes of North America, North of Mexico*. University Press of Idaho, Idaho.
- Skrabulis JP, Flory AR, Raffel TR (2020) Direct onshore wind predicts daily swimmer's itch (avian schistosome) incidence at a Michigan beach. *Parasitology* 147:431–440. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000074>
- Seppälä O, Karvonen A, Kuosa M, *et al* (2013) Are sick individuals weak competitors? Competitive ability of snails parasitized by a gigantism-inducing trematode. *PLoS One* 8:1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079366>
- Soldánová M, Kostadinova A (2011) Rapid colonisation of *Lymnaea stagnalis* by larval trematodes in eutrophic ponds in central Europe. *Int J Parasitol* 41:981–990. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.05.005>
- Soldánová M, Selbach C, Kalbe M, *et al* (2013) Swimmer's itch: Etiology, impact, and risk factors in Europe. *Trends Parasitol* 29:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.002>

- Sorensen RE, Minchella DJ (2001) Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology* 123:S3–S18. <https://doi.org/10.1017/S0031182001007843>
- Szidat L (1951) Cercarias schistosomicas y dermatitis schistosomica humana en la República Argentina. *Comun del Inst Nac Investig las Ciencias Nat* 2:129–150.
- Szidat L (1958) Investigaciones sobre *Cercaria chascomusi* n. sp. Agente causal de la una nueva enfermedad humana en la Argentina. *Boletín del Mus Ciencias Nat “Bernardino Rivadavia” e Inst Nac Investig las Ciencias Nat Ciencias Zoológicas* 18:1–16.
- Tkach V, Pawlowski J, Mariaux J (2000) Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial lsrDNA sequences. *Int J Parasitol* 30:83–93. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00163-0)
- Valdovinos C, Balboa C (2008) Cercarial dermatitis and lake eutrophication in south-central Chile. *Epidemiol Infect* 136:391–394. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008734>
- Valdovinos C (2006) Estado de conocimiento de los Gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70:88–95. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100014>
- Walker JC (1979) *Austrobilharzia terrigalensis*: A schistosome dominant in interspecific interactions in the molluscan host. *Int J Parasitol* 9:137–140. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(79\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(79)90104-8)
- Żbikowska E (2004) Infection of snails with bird schistosomes and the threat of swimmer’s itch in selected Polish lakes. *Parasitol Res* 92:30–35. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0997-0>

CAPÍTULO II

ESQUISTOSOMAS AVIARES EN AVES ANÁTIDAS DEL CENTRO Y SUR DE CHILE

1. INTRODUCCIÓN

Los esquistosomas (Digenea: Schistosomatidae) son trematodos habitantes del torrente sanguíneo de aves y mamíferos, incluyendo el género *Schistosoma* Weinland, 1858, el cual tiene al ser humano como hospedero definitivo, siendo así el más estudiado. Dentro de esta familia se indican un total de 17 géneros, de los cuales 13 parasitan a diversos ordenes de aves acuáticas bien dulceacuícolas o marinas (Gibson *et al.* 2002; Horák *et al.* 2015; Flores *et al.* 2021; Lorenti *et al.* 2022). No obstante, el género más diverso es *Trichobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920, siendo representado por aproximadamente 40 especies distribuidas globalmente con las aves del orden Anseriformes como sus principales hospederos definitivos (Horák *et al.* 2012, 2015).

El ciclo biológico de estos parásitos es relativamente más simple en comparación con otros digeneos, ya que requiere de sólo un hospedero intermediario, un caracol acuático. El ciclo inicia cuando las aves liberan los huevos a la columna de agua, bien a través de las heces o mediante las secreciones nasales, para que luego eclosione un miracidio el cual buscará de forma específica a su hospedero intermediario, desarrollándose así los estadios larvarios para que finalmente emerja una furcocercaria que buscará a su hospedero definitivo en el agua (Horák y Kolářová 2011; Horák *et al.* 2012). Una vez tome contacto con su hospedero final, esta furcocercaria se convertirá en una esquistosomula, la cual viaja a través del torrente sanguíneo para madurar sexualmente y reiniciar su ciclo biológico. No obstante, estas furcocercarias pueden igualmente parasitar a seres humanos, causando brotes de una afección cutánea conocida como dermatitis cercarial (Horák *et al.* 2015).

Si bien históricamente se ha reconocido la especificidad de los esquistosomas aviares hacia sus diferentes hospederos intermediarios (Horák y Kolářová 2011; Horák *et al.* 2015), sólo recientemente se ha discutido sobre la especificidad de los esquistosomas adultos hacia sus hospederos definitivos (Brant y Loker 2009). Entre algunos ejemplos se pueden citar a

Allobilharzia visceralis Kolářová, Rudolfová, Hampl y Skírnisson, 2006 parasitando exclusivamente a cisnes en el hemisferio Norte, *Anserobilharzia brantae* Brant, Jouet, Ferte y Loker, 2013 en gansos, *Trichobilharzia physellae* (Talbot, 1936) McMullen y Beaver, 1945 en patos buceadores y *Trichobilharzia querquedulae* McLeod, 1937 en patos ali-azulados (Kolářová *et al.* 2006; Brant 2007; Brant y Loker 2009; Brant *et al.* 2013; Ebbs *et al.* 2016). Si bien parecen ser casos particulares, el uso de las herramientas moleculares y análisis filogenéticos permitirá establecer si este fenómeno se extiende a otras especies de esquistosomas aviares (Brant y Loker 2009).

En Sudamérica existen contados esfuerzos relacionados con la clasificación y sistemática de los esquistosomas parasitando aves acuáticas en general (Flores *et al.* 2015, 2021; Ebbs *et al.* 2016; Pinto *et al.* 2017; Lorenti *et al.* 2022). Mientras que en el caso particular de los anátidos neotropicales, sólo cinco especies han sido registradas como hospederos definitivos de esquistosomas aviares, entre estas especies silvestres se encuentran el pato gargantillo (*Anas bahamensis* Linnaeus, 1758), el pato jergón grande (*Anas georgica* Gmelin, 1789), pato capuchino [*Spatula versicolor* (Vieillot, 1816)] y el cisne de cuello negro [*Cygnus melancoryphus* (Molina, 1782)] en Argentina y Brasil (Travassos *et al.* 1969; Ebbs *et al.* 2016; Flores *et al.* 2021), y el pato criollo [*Cairina moschata* (Linnaeus, 1758)] como especie doméstica en Brasil (Freitas y Costa 1972; Leite *et al.* 1978, 1979; Pinto *et al.* 2017).

Si se considera la riqueza total de aves anátidas en el Neotrópico, sólo una pequeña fracción de estas han sido reportadas como hospederos definitivos de esquistosomas, sin embargo, esto no sería debido a una reducida riqueza de estos parásitos, sino más bien a un limitado enfoque en el estudio de su helmintofauna como tal (Agüero *et al.* 2016; Oyarzún-Ruiz y González-Acuña 2021). A pesar de este pequeño abanico de hospederos, se han descrito cinco especies pertenecientes a tres géneros de esquistosomas aviares, *Trichobilharzia*, *Nasubilharzia* Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021 y *Dendritobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920 (Leite *et al.* 1978; Flores *et al.* 2015; Ebbs *et al.* 2016), además de otros dos taxones de clasificación incierta; *Trichobilharzia* sp. en *S. versicolor* (Szidat 1951) y *Schistosoma pirajai* Travassos, 1932 en *A. bahamensis* (Travassos *et al.* 1969), y uno aún no descrito con el potencial de corresponder a un género nuevo (Pinto *et al.* 2017).

Respecto a las especies de esquistosomas adultos descritos en Sudamérica, dentro del género *Trichobilharzia* se puede mencionar a *Trichobilharzia jequitibaensis* Leite, Costa y Costa, 1978 parasitando a *C. moschata* en Brasil (Leite *et al.* 1978) y *T. querquedulae* en *S. versicolor* de Argentina, con sólo el segundo analizado a nivel molecular (Ebbs *et al.* 2016). En el caso del género *Nasubilharzia*, sólo la especie *Nasubilharzia melancorhypha* Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021 ha sido caracterizada tanto morfológica como molecularmente (Flores *et al.* 2021). En el caso de *Dendritobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920, éste ha sido mencionado en dos ocasiones, *Dendritobilharzia pulverulenta* (Braun, 1901) Skrjabin, 1924 en *C. moschata* como hospedero definitivo en Brasil (Freitas y Costa 1972; Leite *et al.* 1982), y *Dendritobilharzia rionegrensis* Martorelli, 1981 en la tagua de frente roja (*Fulica rufifrons* Philippi y Landbeck, 1861) en Argentina (Martorelli 1981). Ninguno de estos dos últimos ha sido caracterizado a nivel molecular. Es así como queda en evidencia la falta de mayores análisis, específicamente filogenéticos, en los esquistosomas parasitando aves dulceacuícolas. Desafortunadamente, esta situación no es muy diferente en el caso de las aves marinas sudamericanas (Brant *et al.* 2017; Vanstreels *et al.* 2018; Lorenti *et al.* 2022).

En el caso de Chile, si bien existen dos registros de esquistosomas adultos desde dos aves acuáticas, flamenco chileno (*Phoenicopterus chilensis* Molina, 1782) y *C. melancoryphus*, ninguno de estos dos estudios realizó una caracterización morfológica ni molecular de dichos trematodos, ya que fueron hallazgos histopatológicos (Paré y Black 1999; Oyarzún-Ruiz *et al.* 2019). Dicho eso, este estudio busca caracterizar morfológica y molecularmente de los esquistosomas aviares parasitando anátidos en Chile, contribuyendo así al conocimiento de este grupo de parásitos escasamente estudiados en el continente Sudamericano.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.Hipótesis 2

“Teniendo en consideración la especificidad de los esquistosomas aviáres entre diferentes especies de anátidos, las comunidades de esquistosomas de patos y cisnes de cuello negro son distintas”.

2.2.Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Describir las diferentes poblaciones de esquistosomas aviáres en aves anátidas colectadas en diversas áreas de las zonas Centro y Sur de Chile, estableciendo los hospederos que participan en el ciclo biológico de cada especie de esquistosoma aviar identificado.

2.2.2. Objetivos específicos

- i. Identificar y caracterizar morfológica- como molecularmente los trematodos Schistosomatidae aislados desde cada una de las especies anátidas.
- ii. Determinar los hospederos definitivos que participan en los ciclos biológicos de cada especie de esquistosoma aviar identificado.
- iii. Estimar los descriptores parasitológicos de prevalencia, intensidad media y abundancia media para cada especie de trematodo Schistosomatidae aislado desde cada especie aviar colectada.
- iv. Analizar si hay una asociación entre los descriptores parasitológicos de prevalencia y abundancia de los trematodos Schistosomatidae respecto a los factores de especie, edad y sexo de los anátidos muestreados.
- v. Determinar el grado de especificidad de cada una de las especies de esquistosomas aviáres respecto de las especies de anátidos muestreados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Colecta de aves

Se realizó un muestreo de aves pertenecientes al orden Anseriformes durante el período comprendido entre enero de 2019 a enero de 2021 en estanques, humedales, lagos, lagunas y zonas anegadas de las regiones del Ñuble, Biobío y Los Ríos. Debido al delicado estado de conservación de algunas especies anátidas en territorio nacional, como el cisne de cuello negro, y a la restricción en cuanto a especie, número y período de caza de otras especies de patos (SAG 2017), se realizó un muestreo por conveniencia de dichas aves.

En una primera instancia, se acudió a CONAF de la Región de Los Ríos la que, tras aprobar el “Permiso de Investigación en Áreas Silvestres Protegidas”, permitió acceder a las carcasas de las aves encontradas muertas durante los recorridos rutinarios por parte de guardaparques del sitio Ramsar Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter. Dicho muestreo fue especialmente dirigido hacia la colecta de *C. melancoryphus*, los cuales poseen una importante colonia reproductiva en dicha área protegida (CONAF 2019). Así mismo, se consideró dentro del muestreo aquellos cisnes de cuello negro que fueron eutanasiados en el Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre de la Universidad de Concepción, sede Chillán. El número mínimo de cisnes a muestrear fue de 21 ejemplares por año, valor establecido a partir del estudio realizado por Oyarzún-Ruiz *et al.* (2019), quienes en el transcurso de 1 año pudieron coleccionar dicho número de carcasas desde el sitio Ramsar antes indicado. Se estableció arbitrariamente este número y no mediante un cálculo de tamaño muestral, ya que esta especie se encuentra protegida por la Ley de Caza del estado, prohibiéndose en territorio nacional su cacería durante todo el año (SAG 2017), por lo que sólo se pudo acceder a sus carcasas a través de la colecta que realiza CONAF periódicamente. Por otro lado, se recurrió a cazadores certificados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) acorde a la Ley 19.473 de la misma institución para la colecta de anátidos de otras especies en las regiones del Ñuble, Biobío y Los Ríos. Según lo establecido por la Ley, el período de caza está comprendido entre el 1 de abril a 31 de julio de cada año, con las siguientes especies de anseriformes incluidas en dicha ley, respetando las cuotas permitidas para la temporada de caza; *A. georgica*, *Anas flavirostris* Vieillot, 1816, *Mareca sibilatrix* (Poepfig, 1829) y *Spatula cyanoptera* (Vieillot, 1816) (SAG 2017). Así mismo se consideró como parte del muestreo

aquellas aves anátidas, provenientes bien de la región del Biobío o del Ñuble, que llegaron al Centro de Rescate de Fauna Silvestre de la Universidad de Concepción, sede Chillán, y que por distintas razones fueron eutanasiadas.

3.2.Métodos

3.2.1. Hospederos

a. Identificación aves y tamaño muestral

La identificación de las especies aviarias y especificación del sexo como de la edad (juvenil, adulto) de cada una, se determinó acorde a lo descrito por Martínez y González (2017). El tamaño muestral de las aves a colectar mediante el permiso de Caza del SAG se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$n_{(95\%)} = (4 * p * q) / L^2$$

Esta fórmula permite un cálculo del tamaño muestral (“n”) con un 95% de confianza en una población de tamaño desconocido, pero con la prevalencia del parásito de interés previamente registrada; “p” representa la proporción individuos positivos al parásito (prevalencia del parásito), mientras que “q” se refiere a la proporción de individuos negativos al éste, y por ende complementario con “p”, finalmente “L” se refiere al error admisible (L= 0,05). Se eligió arbitrariamente la prevalencia indicada por Brant y Loker (2009), 94%, ya que fue un estudio que abarcó la caracterización de las diferentes especies de esquistosomas presentes en diversas especies de patos y cisnes, objetivo similar al propuesto en el presente proyecto. Dicho esto, el tamaño muestral calculado correspondió a 90 aves en total.

3.2.2. Esquistosomas aviarios

a. Identificación trematodos adultos

i. *Necropsia parasitaria*

Las carcasas colectadas en las regiones del Ñuble y Biobío fueron trasladadas al Laboratorio de Parásitos y Enfermedades de Fauna Silvestre, Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad de Concepción, mientras que aquellas aves colectadas en la región de Los Ríos fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Austral de Chile. En ambos laboratorios se

examinaron mucosas y conchas nasales, corazón y sus grandes vasos sanguíneos, arterias mesentéricas y sus ramificaciones, hígado y riñón, según lo indicado por Lutz *et al.* (2017). Los trematodos aislados fueron relajados en solución salina citratada para a continuación ser fijados y preservados en etanol 80%. Dicha concentración de etanol permite teñir, usar microscopía electrónica de barrido (SEM) y realizar técnicas moleculares en los especímenes (Kolářová *et al.* 2010; Lutz *et al.* 2017).

ii. *Identificación morfológica*

Para realizar la caracterización morfológica de los vermes, estos fueron teñidos con Alum Carmín, deshidratados en concentraciones crecientes de etanol (70-100%), diafanizados en aceite de clavo y finalmente montados de forma permanente en Bálsamo de Canadá para su revisión bajo microscopía de luz (Lutz *et al.* 2017). Las capturas de imágenes como las mediciones de los trematodos se realizaron con el software Motic Images Plus 2.0 asociado al microscopio óptico MOTIC BA310, usando los objetivos 4x, 10x y 40x. Del total de imágenes obtenidas se eligieron algunas de ellas para luego imprimirlas, calcar su silueta y los órganos de mayores dimensiones, que además fueron utilizados como guía para finalmente dibujar las estructuras internas más pequeñas de cada trematodo mientras estos eran observados bajo el microscopio óptico con los objetivos 10x y 40x.

A continuación, se compararon las mediciones y morfología interna como externa con las claves taxonómicas de Fain (1955, 1956, 1959), Travassos *et al.* (1969), Ulmer y Vande Vusse (1970), Farley (1971), Leite *et al.* (1978), Vande Vusse (1980), Martorelli (1981), McDonald (1981), Blair e Islam (1983), Schell (1985), Islam (1986), Rind (1989), Gibson *et al.* (2002), Kolářová *et al.* (2006), Brant y Loker (2009), Brant *et al.* (2013), Flores *et al.* (2021) y Davis *et al.* (2022).

La microscopía electrónica de barrido (MEB) se realizó utilizando el mismo protocolo ya mencionado en la sección de Material y Métodos del capítulo I.

iii. *Extracción de ADN y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

De los vermes colectados en cada especie aviar se destinó un pool para la realización de técnicas moleculares, debido a que la diferenciación entre especies es compleja. Los vermes fueron preservados en etanol absoluto y a continuación almacenados a -18 °C

(Kolářová *et al.* 2010; Horák *et al.* 2012; Christiansen *et al.* 2016). Se utilizó ADN genómico el cual fue extraído utilizando el kit DNeasy blood and animal tissue (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad de ADN para cada muestra extraída se midió con un Espectrofotómetro Epoch™ Microplate. Las muestras con valores entre 1.6 y 2.0 para la proporción de absorbancia A260/A280 fueron consideradas puros y adecuados para la amplificación mediante PCR (Khare *et al.* 2014). Finalmente, el ADN se preservó a -24°C hasta la realización del análisis molecular.

El PCR Touchdown, cebadores, volúmenes de reactivos en cada reacción y protocolos de amplificación para los genes COI y 28S fueron los mismos detallados en la sección de Material y Métodos del capítulo I.

iv. *Análisis filogenéticos*

La verificación de calidad y edición de secuencias, construcción del marco filogenético como las reconstrucciones filogenéticas (inferencia bayesiana [IB] y máxima verosimilitud [MV]) de los genes 28S y COI, como el concatenado 28S-COI se realizaron acorde a lo detallado en la sección Material y Métodos del capítulo I. Las secuencias que formaron parte del marco filogenético están detalladas en la Tabla 1.

3.2.3. Descriptores parasitológicos y Análisis estadísticos

Los descriptores parasitológicos de prevalencia (P), intensidad de infección (I), intensidad media (I_M) y abundancia media (A_M) de los esquistosomas adultos se calcularon e interpretaron acorde a Bush *et al.* (1997).

La asociación entre la especie, edad y sexo del ave, y la localidad de origen del ave con la presencia/ausencia de parásitos se analizó mediante regresiones logísticas multifactoriales. La asociación entre las mismas variables y la abundancia de parásitos se analizó mediante regresiones binomiales negativas multifactoriales. En el caso de la especie de ave, se estableció a la especie *M. sibilatrix* como categoría de comparación, y las otras especies como variables ‘dummies’. En el caso de la localidad, se estableció la localidad de Reloca (Camino a Cato, región de Ñuble) como categoría base de comparación, y las otras localidades se consideraron variables ‘dummies’. En ambos casos, regresiones logísticas y regresiones binomiales negativas, se comenzó con el modelo más complejo (con todas las

variables mencionadas) y se eliminaron las variables de a una, removiendo la variable con mayor valor de probabilidad asociada (la menos significativa estadísticamente). El mejor modelo se seleccionó mediante la prueba de razón de verosimilitud; de tal modo que la remoción de cualquiera de las variables del modelo seleccionado signifique la pérdida significativa de verosimilitud. Los análisis mencionados se realizaron con el software Stata/BE 17 StataCorp LLC.

Se evaluó la especificidad de cada especie de esquistosoma aviar respecto a las distintas especies aviarias, mediante el índice de Especificidad de Poulin y Moulliot (S_{TD}) (Poulin 2007) que permite una comparación entre diferentes taxa de parásitos utilizando una gama de diferentes especies hospederas. Este índice mide la distinción taxonómica (número de “pasos” desde género a Phylum) promedio de todas las posibles parejas de especies hospederas usadas por una especie parásita. El valor del índice es inversamente proporcional a la especificidad; un alto valor del índice significa que en promedio los hospederos de una especie de parásito no están cercanamente relacionados entre ellos. Al comparar los valores del S_{TD} entre diferentes parásitos, aquel con el menor valor indicará un mayor nivel de especificidad, caso opuesto si el valor es mayor. El valor de $S_{TD}=1$ sugiere un parásito altamente específico (Poulin 2007; Poulin *et al.* 2011).

Tabla 1. Secuencias obtenidas en GenBank. Solo se detalla la información de los esquistosomas aviares dentro o cercanamente relacionados con el clado DAS, mientras que el resto de los taxa forman parte del grupo externo (“outgroup”).

Taxón	Hospedero	Localidad	Código de acceso Genbank	
			28S	COI
C293 Lineage I	<i>Chilina dombeyana</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Laguna Chica de San Pedro, Chile	OM307635	OM321410
C791 Lineage I	<i>Chilina dombeyana</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Laguna Chica de San Pedro, Chile	OM307633	OM321411
C294 Lineage II	<i>Chilina dombeyana</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Laguna Chica de San Pedro, Chile	OM307645	OM321415
C662 Lineage II	<i>Chilina dombeyana</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Laguna Chica de San Pedro, Chile	OM307643	OM321417
Schistosomatidae sp. MSB Para 7973 Lineage 3	<i>Chilina dombeyana</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Mascardi, Argentina	KC113055	KC113073
Schistosomatidae sp. MSB Para 7977 Lineage 3	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago La Patagua, Argentina	KC113059	KC113075
Schistosomatidae sp. MSB Para 7959 Lineage 2	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Reservorio Pellegrini, Argentina	KC113065	KC113078
Schistosomatidae sp. MSB Para 7969 Lineage 2	<i>Chilina perrieri</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Musters, Argentina	KC113071	KC113086
<i>Nasubilharzia melancorhypha</i>	<i>Cygnus melancoryphus</i> (Aves, Anatidae)	Lago Mari Menuco, Lago Pellegrini, Argentina	MW000331	MW012493
Schistosomatidae sp. MSB Para 7954 Lineage 1	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Reservorio Pellegrini, Argentina	KC113051	KC113072
Schistosomatidae sp. MSB Para 7952 Lineage 1	<i>Chilina gibbosa</i> (Gastropoda, Chiliniidae)	Lago Nahuel Huapi, Argentina	KC113049	-
Schistosomatidae sp. ex <i>Melanoides tuberculata</i>	<i>Melanoides tuberculata</i> (Gastropoda, Thiaridae)	Emiratos Árabes Unidos	JX875068	JX875069
Schistosomatidae sp. CRAM2127	<i>Spheniscus magellanicus</i> (Aves, Spheniscidae)	Rio Grande, Brasil	MG670449	MG707172
Schistosomatidae sp. W829	<i>Larus dominicanus</i> (Aves, Laridae)	Argentina	KX302891	KX302898
Schistosomatidae sp. W640	<i>Siphonaria lessonii</i> (Gastropoda, Siphonariidae)	Argentina	-	KX302897
Schistosomatidae sp. W217	<i>Haminoea japonica</i> (Gastropoda, Haminoeidae)	USA	-	KX302895
<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	<i>Gallus gallus</i> (Aves, Phasianidae)	USA	AY157241	AY157187
<i>Dendritobilharzia</i> sp. W499	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	USA	-	KX302892

Schistosomatidae sp. 2 W402	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	USA	MF598180	MF598175
Schistosomatidae sp. 2 W165	<i>Aix sponsa</i> (Aves, Anatidae)	USA	-	MF598174
Schistosomatidae sp. 2 W480	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	USA	MF598182	MF598176
Schistosomatidae sp. 1 W847	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Brasil	-	MF598177
Schistosomatidae sp. 1 W848	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Brasil	MF598183	MF598178
<i>Gigantobilharzia huronensis</i>	<i>Agelaius phoeniceus</i> (Aves, Icteridae)	USA	AY157242	AY157188
Avian schistosomatid sp. W2081	<i>Ceratophallus natalensis</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Kenia	AY858887	AY829247
<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	<i>Spatula cyanoptera</i> (Aves, Anatidae)	USA	FJ174470	-
<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	<i>Spatula discors</i> (Aves, Anatidae)	USA	FJ174468	FJ174511
<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	<i>Spatula versicolor</i> (Aves, Anatidae)	Argentina	-	KU057184
<i>Trichobilharzia</i> sp. A SVB 2009 W149	<i>Mareca americana</i> (Aves, Anatidae)	USA	FJ174472	FJ174524
<i>Trichobilharzia</i> sp. B SVB 2009	<i>Mareca americana</i> (Aves, Anatidae)	USA	-	FJ174528
<i>Trichobilharzia physellae</i>	<i>Bucephala albeola</i> (Aves, Anatidae)	USA	FJ174474	-
<i>Trichobilharzia physellae</i>	"Mallard" (Aves, Anatidae)	USA	-	MK433251
<i>Trichobilharzia physellae</i>	<i>Physella gyrina</i> (Gastropoda, Physidae)	Canadá	-	KT831365
<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix</i> sp. (Gastropoda, Lymnaeidae)	Alemania	FJ711768	FJ174530
<i>Trichobilharzia regenti</i>	<i>Radix peregra</i> (Gastropoda, Lymnaeidae)	República Checa	AY157244	AY157190
<i>Trichobilharzia szidati</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Gastropoda, Lymnaeidae)	República Checa, Bielorrusia	AY157245	MT708491
<i>Trichobilharzia mergi</i>	<i>Mergus serrator</i> (Aves, Anatidae)	Islandia	JX456158	JX456172
<i>Trichobilharzia</i> sp. C	<i>Lophodytes cucullatus</i> (Aves, Anatidae)	USA	-	FJ174529
<i>Trichobilharzia</i> sp. D W376 <i>Stagnicola</i>	<i>Stagnicola</i> sp. (Gastropoda, Lymnaeidae)	Canadá	FJ174481	FJ174485
<i>Trichobilharzia stagnicolae</i>	<i>Mergus merganser</i> (Aves, Anatidae)	USA	FJ174478	FJ174490
<i>Trichobilharzia</i> sp. E W332 <i>Stagnicola</i>	<i>Stagnicola</i> sp. (Gastropoda, Lymnaeidae)	Canadá	FJ174480	FJ174483
<i>Trichobilharzia</i> sp. PYOL010	<i>Radix rubiginosa</i> (Gastropoda, Lymnaeidae)	Tailandia	-	MW525202
<i>Trichobilharzia australis</i> W5009N	<i>Anas superciliosa</i> (Aves, Anatidae)	Australia	OK104141	OK357975
<i>Trichobilharzia</i> sp. HAP2013 W701	<i>Stenophysa marmorata</i> (Gastropoda, Physidae)	Brasil	KJ855994	KJ855995
<i>Anserobilharzia brantae</i>	<i>Gyraulus parvus</i> (Gastropoda, Planorbidae)	USA	FJ174466	MK433247
<i>Allobilharzia visceralis</i>	<i>Cygnus columbianus</i> (Aves, Anatidae)	USA	EF114223	EF114224

<i>Bilharziella polonica</i>	<i>Anas platyrhynchos</i> (Aves, Anatidae)	Ucrania	AY157240	AY157186
Avian schistosomatid sp. W1285	<i>Biomphalaria sudanica</i> (Gastropoda, Planorbidae)	Kenia	AY858886	AY829246
<i>Heterobilharzia americana</i>	-	-	AY157246	AY157192
<i>Schistosomatium douthitti</i>	-	-	AY157247	AY157193
<i>Schistosoma intercalatum</i>	-	-	AY157262	AY157208
<i>Schistosoma bovis</i>	-	-	FJ897156	MK757181
<i>Schistosoma haematobium</i>	-	-	AY157263	AY157209
<i>Schistosoma mattheei</i>	-	-	AY157265	AY157211
<i>Schistosoma margrebowiei</i>	-	-	AY157260	AY157206
<i>Schistosoma leiperi</i>	-	-	AY157261	AY157207
<i>Schistosoma indicum</i>	-	-	AY157258	AY157204
<i>Schistosoma spindale</i>	-	-	AY157257	AY157203
<i>Schistosoma nasale</i>	-	-	AY157259	AY157205
<i>Schistosoma rodhaini</i>	-	-	AY157256	AY157202
<i>Schistosoma mansoni</i>	-	-	AY157173	NC002545
<i>Schistosoma turkestanicum</i>	-	-	AY157254	KC456234
<i>Schistosoma edwardiense</i>	-	-	AY197344	MT886702
<i>Schistosoma incognitum</i>	-	-	AY157255	AY157201
<i>Schistosoma hippopotami</i>	-	-	AY197343	AY197346
<i>Schistosoma japonicum</i>	-	-	Z46504	EU325879
<i>Schistosoma mekongi</i>	-	-	AF465922	AY157199
<i>Schistosoma sinensium</i>	-	-	AF465924	AY157197
<i>Schistosoma malayensis</i>	-	-	AY157252	AY157198
<i>Bivitellobilharzia nairi</i>	-	-	AY858888	JQ975011
<i>Bivitellobilharzia loxodontae</i>	-	-	JN579949	JN579948
<i>Macrobilharzia macrobilharzia</i>	-	-	AY858885	AY829248
Schistosomatidae sp. W688	-	-	KF672860	-
<i>Austrobilharzia</i> sp.	-	-	JF742195	-
<i>Austrobilharzia terrigalensis</i>	-	-	AY157249	AY157195
<i>Austrobilharzia variglandis</i>	-	-	AY157250	AY157196



<i>Ornithobilharzia canaliculata</i>	-	-	AY157248	AY157194
<i>Spirorchis scripta</i>	-	-	AY222174	AY829243
<i>Learedius learedi</i>	-	-	AY604707	OK039252
<i>Hapalotrema mehrai</i>	-	-	AY604708	AY829244



4. RESULTADOS

4.1. Aves anátidas como hospederos definitivos de esquistosomas

Se realizó la necropsia parasitaria a un total de 95 aves entre patos y cisnes provenientes de las regiones del Ñuble, Biobío y Los Ríos (Figura 1, Tabla 2). De estas, 58 (61,05%) aves resultaron parasitadas con esquistosomas viscerales y/o nasales. En el caso de los trematodos viscerales, estos fueron aislados principalmente desde el hígado, riñón, corazón e intestinos, aunque en algunos casos también se colectaron unos pocos trematodos desde pulmones y vesícula biliar. Mientras que los esquistosomas nasales fueron aislados desde pequeños vasos sanguíneos presentes en la mucosa nasal de las aves. Además, en algunos casos se aislaron esquistosomas en la cavidad celómica, lo cual fue considerado accidental, ya que en dichas aves se evidenció a través de la necropsia la ruptura de órganos como hígado y corazón, lo cual probablemente ocurrió tras la cacería de estas con rifle.

Desde el punto de vista morfológico, se reportaron cinco taxones para el género *Trichobilharzia*, uno para el género *Nasusbilharzia* y cuatro para el género *Dendritobilharzia*. Del total de aves parasitadas, 51 presentaron infecciones solo con esquistosomas viscerales, uno presentó esquistosomas nasales solamente, y seis aves registraron infecciones mixtas con ambos esquistosomas. De las aves con esquistosomas viscerales, seis de ellas presentaron parasitosis con esquistosomas del género *Dendritobilharzia*. Además, cuatro aves presentaron infecciones mixtas entre *Dendritobilharzia* spp. y otros esquistosomas viscerales, *Trichobilharzia* spp., y ninguna de ellas se encontró en co-infección con esquistosomas nasales.

Además de los taxones antes mencionados, en un ejemplar de *S. cyanoptera* se encontraron algunos estadios inmaduros incompletos en los riñones, los cuales no eran adecuados para su descripción morfológica, por lo cual se destinaron exclusivamente para análisis moleculares. La misma situación ocurrió para unos esquistosomas hepáticos en *C. melancoryphus*, de los cuales sólo se recuperaron fragmentos pobremente preservados, por lo cual se optó solo por su caracterización molecular.

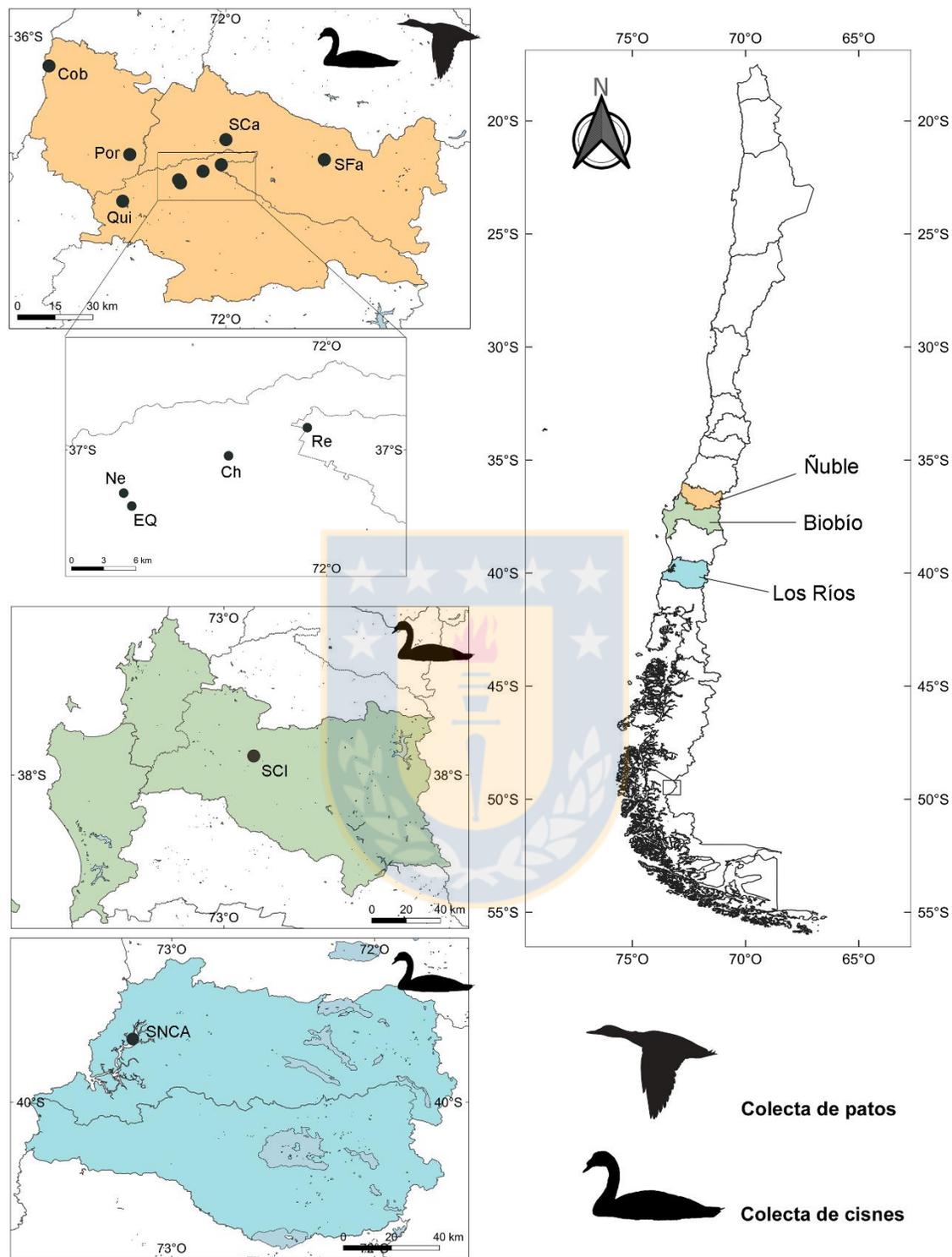


Figura 1. Mapa de las regiones y localidades respectivas que formaron parte del presente estudio. Abreviaturas: Ñuble: Cob= Cobquecura; Por= Portezuelo; Qui= Quillón; Sca= San Carlos; SFa= San Fabián; Ne= Nebuco; EQ= El Quillay; Ch= Chillán; Re= Reloca. Biobío: SCI= Santa Clara. Los Ríos: SNCA= Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter.

Tabla 2. Localidades desde donde se obtuvieron los anátidos que fueron parte del estudio.

Especie de anátido	Localidad	Coordenadas	Ex	Par
<i>Anas flavirostris</i>	El Quillai (Ñuble)	36°39'31,22"S 72°12'11,76"O	5	1
	Nebuco (Ñuble)	36°38'30,6"S 72°11'39,7"O	11	4
	Reloca (Ñuble)	36°34'36,39"S 72° 1'12,65"O	15	7
	Total		31	12
<i>Anas georgica</i>	Nebuco (Ñuble)	36°38'30,6"S 72°11'39,7"O	26	17
	Reloca (Ñuble)	36°34'36,39"S 72° 1'12,65"O	2	1
	Total		28	18
<i>Mareca sibilatrix</i>	Chillán (Ñuble)	36°36'22,37"S 72° 6'8,38"O	1	1
	Nebuco (Ñuble)	36°38'30,6"S 72°11'39,7"O	16	12
	Portezuelo (Ñuble)	36°30'41,8"S 72°20'17,1"O	1	1
	Total		18	14
<i>Spatula cyanoptera</i>	Nebuco (Ñuble)	36°38'30,6"S 72°11'39,7"O	6	6
	Total		6	6
<i>Cygnus melancoryphus</i>	San Fabián (Ñuble)	36°33'14,46"S 71°33'26,99"O	1	1
	Quillón (Ñuble)	36°44'27,39"S 72°27'46,72"O	1	0
	Cobquecura (Ñuble)	36° 7'57,06"S 72°47'37,51"O	1	1
	Ñinquihue (Ñuble)	36°27'50,78"S 71°59'57,51"O	1	0
	Sin datos (Ñuble)	-	2	0
	Santa Clara (Biobío)	37°22'18,89"S 72°17'58,95"O	1	1
	SN Carlos Anwandter (Los Ríos)	39°41'15,77"S 73°11'31,99"O	5	5
	Total		12	8

Abreviaturas: Ex= aves examinadas por localidad; Par= aves parasitadas por localidad

4.2. Descripción morfológica de los estadios adultos

Se describen a continuación los esquistosomas adultos aislados, detallando además su hospedero, sitio de infección y localidad.

4.2.1. *Trichobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920

a. *Trichobilharzia* sp. 1

Descripción. *Macho* (Figura 2, Tablas 3, 7): Vermes filamentosos largos, levemente aplanados dorso-ventralmente. Ventosa oral cónica, terminal, cubierta con pequeñas espinas en lado ventral, bordeando su apertura, mientras que en el borde anterior aparecen algunas espinas de mayor longitud y delgadas. Esófago presenta un pequeño bulbo de ubicación

anterior al acetábulo, el cual tiene las paredes levemente engrosadas respecto al resto del esófago, para luego bifurcarse en dos ciegos delgados que pasan lateral al acetábulo para reunirse posterior a este y anterior a la vesícula seminal. Acetábulo redondeado de mayor diámetro que la ventosa oral, cuya apertura está rodeada de espinas delgadas y largas. Vesícula seminal de aspecto contorsionado dividida en dos segmentos de longitud similar, una anterior denominada vesícula seminal externa, y otra posterior, vesícula seminal interna, la cual está estrechamente asociada a un saco del cirro de pared delgada. Región prostática es fusiforme, y termina en un ducto eyaculador que desemboca en el poro genital de la papila genital, la cual es prominente, sin espinas y ubicada en el borde anterior del canal ginecóforo hacia el lado derecho de la línea media longitudinal del canal. El canal ginecóforo es un surco ventral de mayor ancho respecto al resto del cuerpo, de gran desarrollo muscular y densamente cubierto de pequeñas espinas en sus paredes y a nivel central. Intestino pasa sinuoso a un costado de la vesícula seminal hasta ubicarse sobre la línea media del cuerpo a la altura de la papila. Primer testículo ubicado a corta distancia del borde posterior del canal ginecóforo. El verme de mayor longitud, aunque incompleto, presentó 82 testículos redondeados, pequeños, organizados en una única hilera, alternándose de forma irregular a los lados del intestino. Un segmento de cola presentó una forma espatulada, con el intestino llegando cerca del borde de la cola y el último testículo a cierta distancia del término del intestino.

Hospedero tipo: *Anas flavirostris* (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Hígado, riñón, y menos frecuente en corazón y cavidad celómica.

Localidad tipo: Reloca (región del Ñuble).

Otras localidades: El Quillai, Nebuco (región del Ñuble).

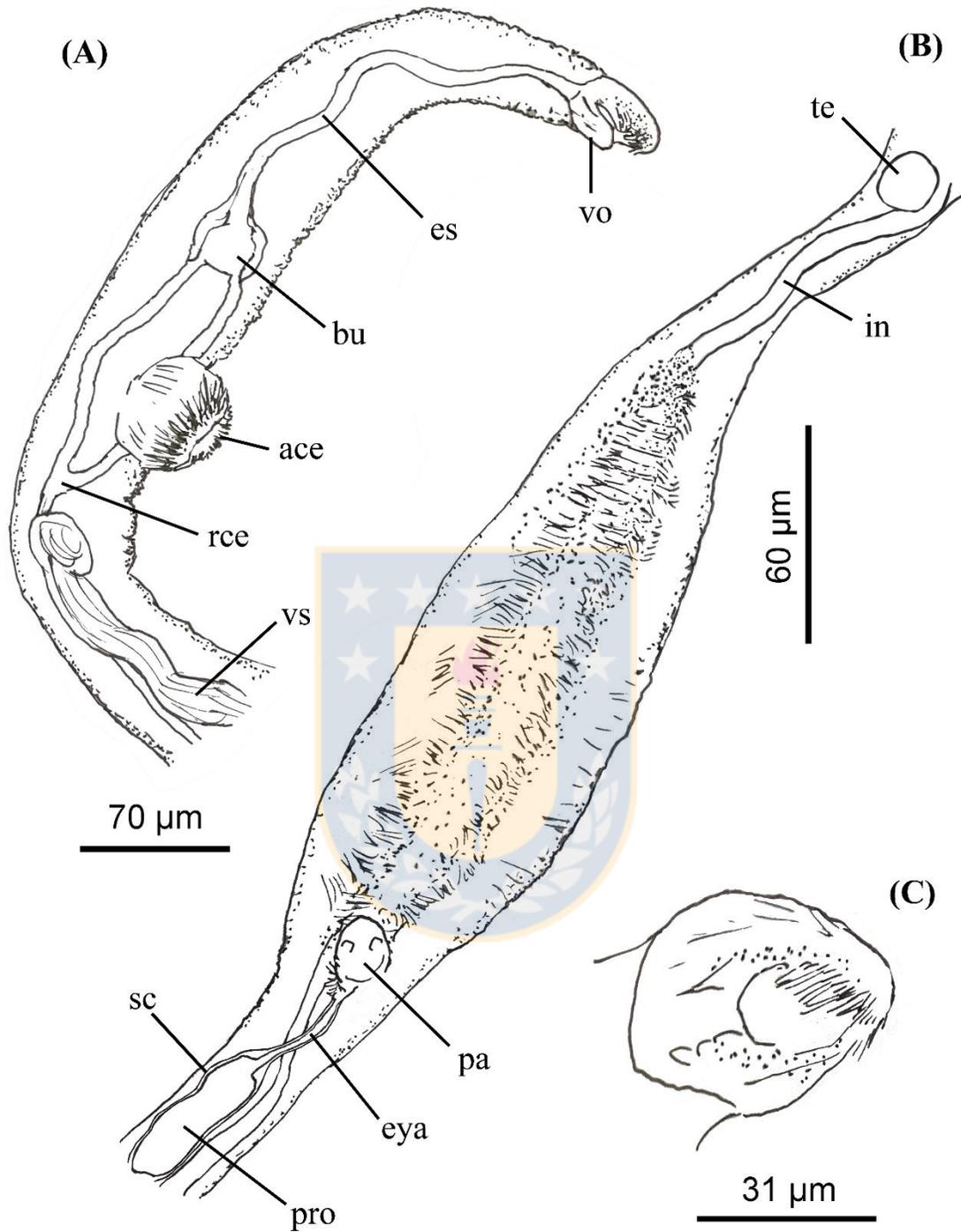


Figura 2. Macho de *Trichobilharzia* sp. 1 aislado desde el pato jergón chico (*Anas flavirostris*). (A) Región anterior del cuerpo, pre-acetabular. (B) Región del canal ginecóforo y (C) Ventosa oral espinosa, con espinas de mayor longitud en apertura oral. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; es= esófago; in= intestino; eya= ducto eyaculador; pa= papila genital; pro= región prostática; rce= reunión cecal; sc= saco del cirro; te= testículo; vo= ventosa oral; vs= vesícula seminal.

b. *Trichobilharzia* sp. 2

Descripción. *Macho* (Figuras 3-4, Tablas 4, 7): Vermes filamentosos largos, levemente aplanados dorso-ventralmente. Ventosa oral cónica, terminal, cubierta con pequeñas espinas en lado ventral, concentradas principalmente en el borde anterior de su apertura, extendiéndose hasta el borde dorsal. Esófago presenta un pequeño bulbo alargado algo distante del acetábulo, el cual luego se bifurca en dos ciegos delgados que pasan lateral al acetábulo para anastomosarse posterior al mismo y anterior a la vesícula seminal. Acetábulo redondeado similar en tamaño a la ventosa oral, cubierto de pequeñas espinas alargadas en torno a su apertura. No se logró observar la vesícula seminal en toda su extensión ni si esta estaba dividida, no obstante, se observó su aspecto contorsionado. Así mismo no se pudo identificar el saco del cirro, ducto eyaculador ni la región prostática. Se observó una papila genital prominente sin espinas en el inicio del canal ginecóforo, dirigida hacia el lado izquierdo de la línea media longitudinal del canal. El canal ginecóforo es un surco delgado, incluso levemente más delgado respecto al segmento anterior del cuerpo, aunque algo más ancho respecto al segmento posterior del cuerpo. Éste está cubierto de múltiples espinas pequeñas en toda su extensión, con algunas espinas más largas en el tercio anterior, el desarrollo muscular de esta estructura es débil. El primer testículo se encuentra a una marcada distancia respecto del borde posterior del canal ginecóforo. El intestino pasa sinuoso entre los testículos. El verme de mayor longitud, aunque incompleto, presentó 100 testículos redondeados, pequeños, alternándose de forma irregular a los lados del intestino.

Hospedero tipo: Anas flavirostris (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Mucosa nasal.

Localidad tipo: Reloca (región del Ñuble).

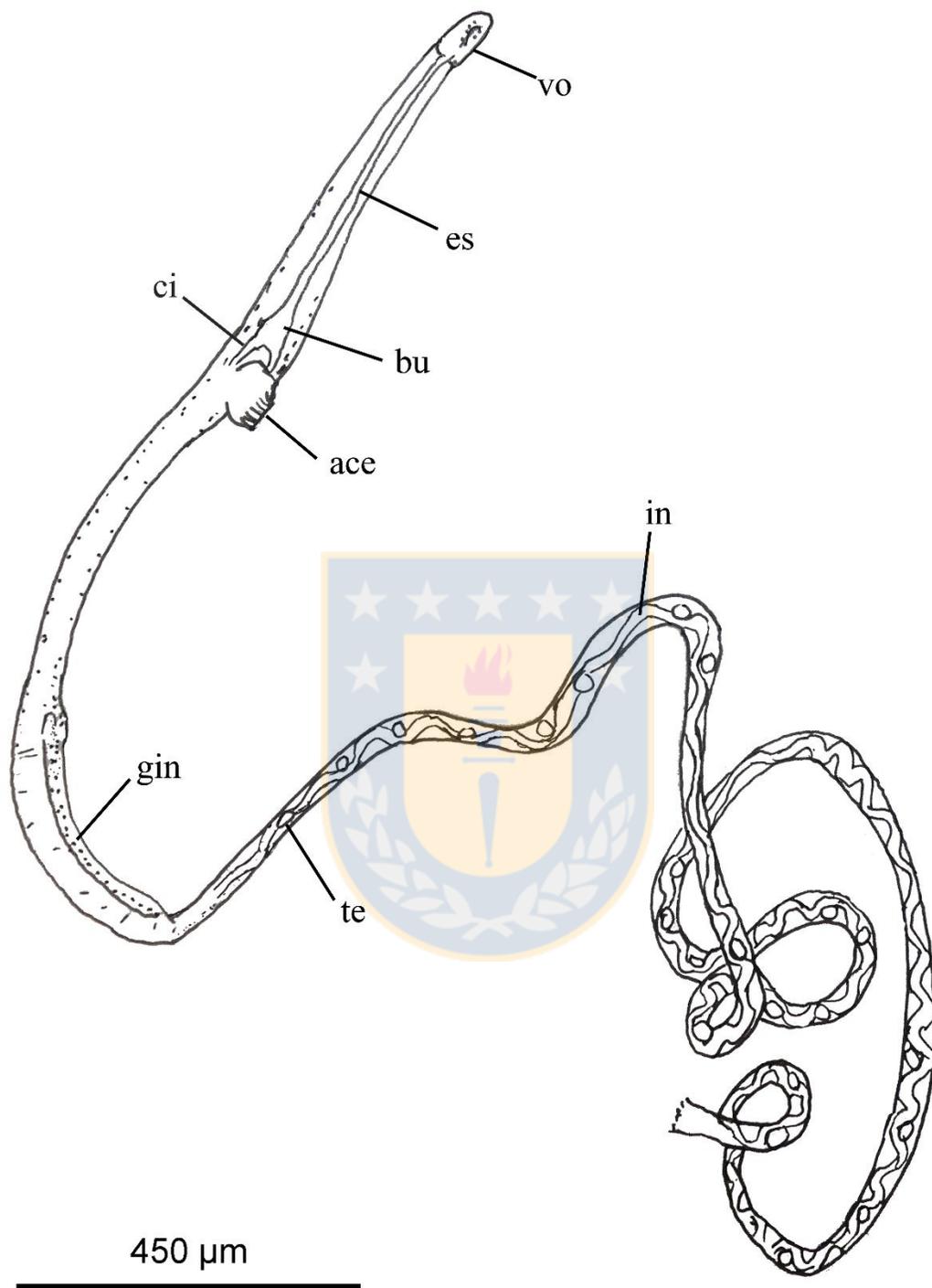


Figura 3. Fragmento del macho de *Trichobilharzia* sp. 2 aislado desde el pato jergón chico (*Anas flavirostris*). Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; ci= ciego intestinal; es= esófago; gin= canal ginecóforo; in= intestino; vo= ventosa oral.

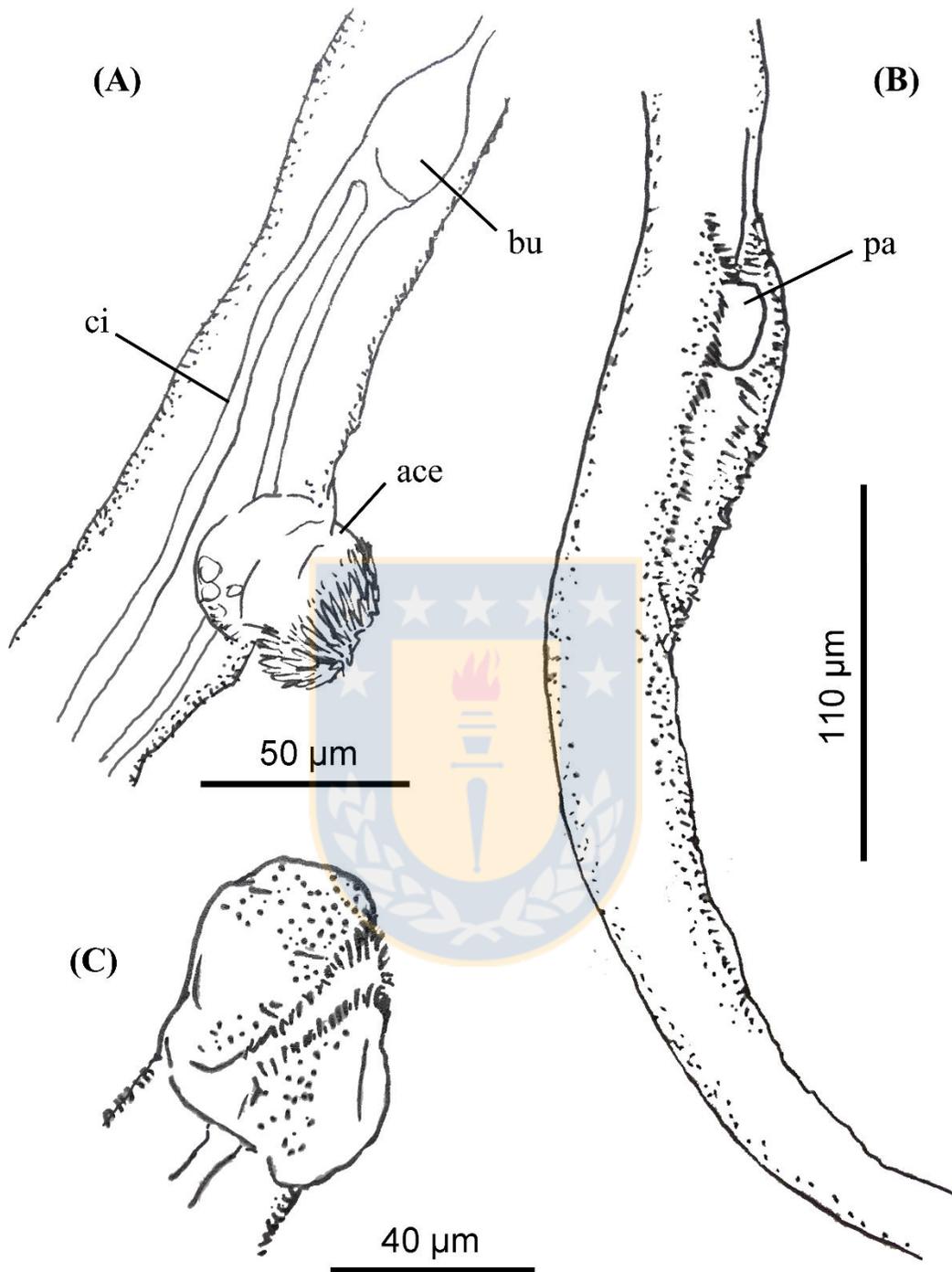


Figura 4. Macho de *Trichobilharzia* sp. 2 aislado desde el pato jergón chico (*Anas flavirostris*). (A) Área acetabular detallando estructuras cercanas al acetábulo. (B) Canal ginecóforo delgado y espinoso. Cuerpo cubierto de pequeñas espinas. (C) Ventosa oral espinosa. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; ci= ciego intestinal; pa= papila genital.

c. *Trichobilharzia* sp. 3

Descripción. *Macho* (Figura 5, Tablas 3, 7): Vermes filamentosos largos, levemente aplanados dorso-ventralmente. Ventosa oral cilíndrica, terminal, cubierta con pequeñas espinas, las cuales se concentran principalmente en el borde anterior de la apertura oral. Esófago presenta un bulbo que se presenta como un ensanchamiento en forma de cono del esófago, con las paredes algo más engrosadas respecto al resto de dicho órgano. Éste luego se bifurca en dos ciegos delgados anterior al acetábulo, pasando lateral a éste y luego se anastomosa como un único ciego o intestino, reunión cecal, posterior a la región prostática y anterior a la papila genital. Acetábulo redondeado, con un diámetro similar al de la ventosa oral, cubierto con espinas largas y delgadas en torno a su apertura. Vesícula seminal contorsionada, sin segmentación visible. El saco del cirro es de pared delgada y bordea a la vesícula seminal en su último tercio, además de abarcar la región prostática y el ducto eyaculador. La región prostática es pequeña y fusiforme. El ducto eyaculador delgado desemboca en la apertura genital de la papila genital. Este último órgano es prominente, ubicado en el lado izquierdo del cuerpo, sin espinas, y al inicio del canal ginecóforo. El canal ginecóforo es un surco cubierto por espinas densamente organizadas, incluso las espinas del tercio posterior del canal parecen ser más largas. El área de dicho canal es de gran desarrollo muscular, levemente más ancho respecto al segmento anterior del cuerpo. El primer testículo está a corta distancia desde el borde posterior del canal. El intestino pasa sinuoso entre los testículos. Dos especímenes completos presentaron 87 y 90 testículos redondeados, pequeños, alternándose de forma irregular a los lados del intestino. La cola presentó una forma redondeada, con el intestino llegando cerca del borde de la cola y el último testículo a poca distancia del término del intestino.

Descripción. *Hembra* (Figura 6, Tablas 3, 7): Verme filamentosos, largo, levemente aplanado dorso-ventralmente. Cuerpo de ancho similar en toda su extensión, excepto en el área del útero, donde es levemente más ancho. Ventosa oral cilíndrica, terminal, escasamente cubierto con pequeñas espinas, concentrándose principalmente en el borde anterior de la apertura oral. Esófago presenta un bulbo que se presenta como un ensanchamiento en forma de cono del esófago. Éste luego se bifurca en dos ciegos delgados anterior al acetábulo, pasando lateral a éste y al útero. La posición de la reunión cecal no logró determinarse. Acetábulo redondeado, con un diámetro similar a la ventosa oral, cubierto con espinas largas

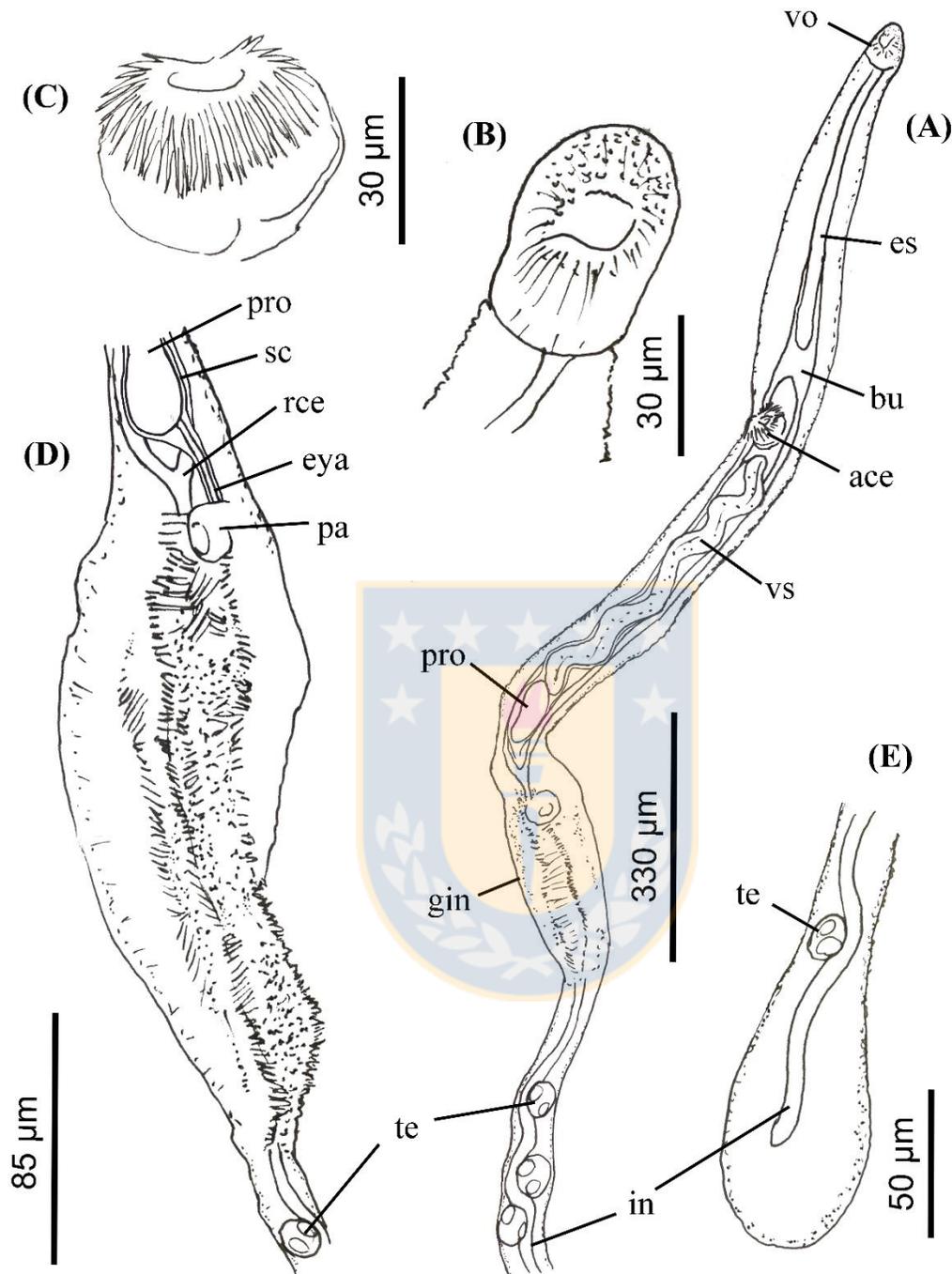


Figura 5. Macho de *Trichobilharzia* sp. 3 aislado desde el pato jergón grande (*Anas georgica*). (A) Segmento anterior del cuerpo y canal ginecóforo. (B) Ventosa oral espinosa. (C) Acetábulo bordeado de espigas largas y delgadas. (D) Canal ginecóforo con un surco típico cubierto de espigas. (E) Cola típica de los esquistosomas aviares. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; es= esófago; eya= ducto eyaculador; gin= canal ginecóforo; in= intestino; pa= papila genital; pro= región prostática; rce= reunión cecal; sc= saco del cirro; te= testículo; vo= ventosa oral; vs= vesícula seminal.

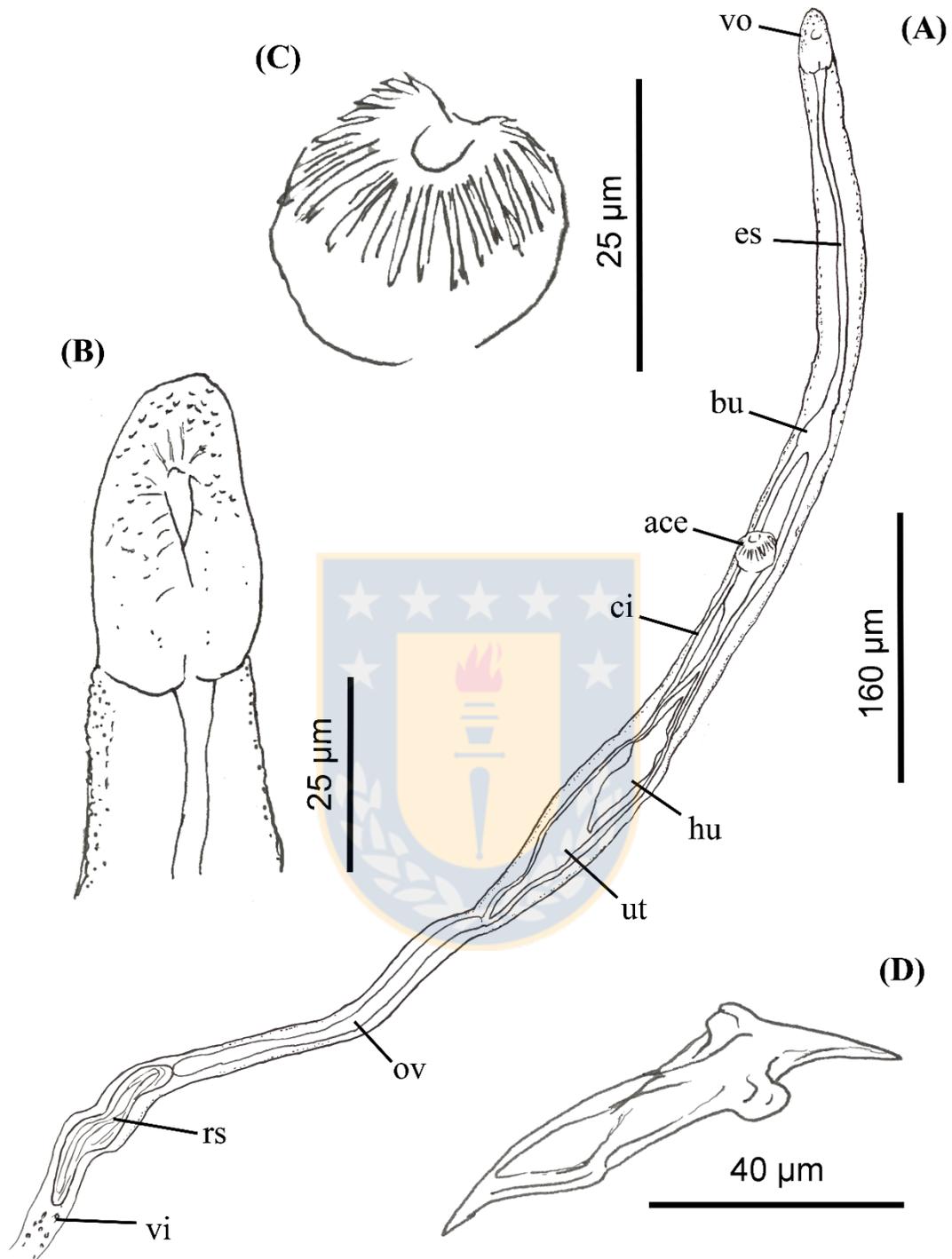


Figura 6. Hembra de *Trichobilharzia* sp. 3 aislado desde el pato jergón grande (*Anas georgica*). (A) Segmento anterior del cuerpo, donde está presente gran parte del sistema reproductivo. (B) Ventosa oral espinosa. (C) Acetábulo con espinas largas y delgadas. (D) Huevo de aspecto colapsado presente en útero. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; ci= ciego intestinal; es= esófago; hu= huevo; ut0 útero; vo= ventosa oral.

y delgadas en torno a su apertura. Apertura genital posterior al acetábulo, a escasa distancia de éste, siendo evidente en los vermes montados en posición lateral. Útero fusiforme de paredes engrosadas, conteniendo un único huevo en su interior. Posteriormente se comunica mediante un estrechamiento del órgano con el ovario, el cual es delgado y alargado. Luego se comunica con el receptáculo seminal, el cual es contorsionado, corto y finamente estriado. Huevo alargado con dos puntas aguzadas, de coloración amarillo pálido, la cáscara tiene un aspecto colapsado.

Hospedero tipo: *Anas georgica* (Aves: Anatidae)

Sitio de infección: Hígado, riñón, y menos frecuente en corazón

Localidad tipo: Nebuco (región del Ñuble).

Otras localidades: Reloca (región del Ñuble).

d. *Trichobilharzia* sp. 4

Descripción. *Macho* (Figura 7, Tablas 3, 7): Vermes filamentosos largos, levemente aplanados dorso-ventralmente. Ventosa oral redondeada, terminal, cubierta con pequeñas espinas, aunque las ubicadas en torno a la apertura oral parecen ser más anchas. Esófago presenta un bulbo cónico de paredes engrosadas, anterior al acetábulo, desde el cual se bifurcan dos ciegos delgados que pasan lateral al acetábulo, hasta anastomosarse posterior a la región prostática y continúan como un ciego común o intestino. Acetábulo redondeado, de diámetro levemente mayor a la ventosa oral, cubierto de espinas delgadas y largas en torno a su apertura. Vesícula seminal contorsionada, dividida en dos secciones, una anterior (vesícula seminal externa) con estriaciones sutiles, y otra posterior (vesícula seminal interna) de aspecto más liso. Saco del cirro de pared delgada y estrechamente asociada a la vesícula seminal interna, región prostática y ducto eyaculador. Región prostática pequeña, fusiforme, estrechamente asociada a la vesícula seminal interna. Ducto eyaculador delgado desemboca en papila genital. Papila genital prominente, anterior al canal ginecóforo, ubicada en lado derecho de la línea media longitudinal del canal en la mayoría de los vermes examinados, aunque en algunos especímenes se observó en el lado izquierdo de la línea media. El canal ginecóforo es un surco cubierto densamente por espinas diminutas, de gran desarrollo muscular y ancho similar al segmento anterior del cuerpo. El primer testículo está a corta

distancia del borde posterior del canal ginecóforo. El intestino pasa sinuoso entre los testículos. Cuatro especímenes completos presentaron 60-89 testículos redondeados, pequeños, alternándose de forma irregular a los lados del intestino. La cola es espatulada, con el intestino llegando cerca del borde la cola y el último testículo casi a la misma altura de éste.

Descripción. *Hembra* (Figuras 8-9, Tablas 3, 7): Vermes filamentosos, levemente aplanados dorso-ventralmente. Cuerpo de ancho similar en toda su extensión, excepto en el área del receptáculo seminal donde es marcadamente más ancho. Ventosa oral cónica, terminal, escasamente cubierto con pequeñas espinas, concentrándose principalmente en los bordes de la apertura oral. Esófago presenta un bulbo pequeño con paredes engrosadas, anterior al acetábulo, para luego dividirse en dos ciegos delgados que pasan lateral al acetábulo y útero. La posición exacta de la reunión cecal no pudo determinarse. Acetábulo ovalado, pequeño, no superando en diámetro a la ventosa oral, cubierto con espinas delgadas y largas en torno a su apertura. Ovario alargado, levemente contorsionado y con una constricción cerca de la mitad de su extensión, dando la apariencia de estar dividido en dos segmentos (bipartito). Útero fusiforme de paredes engrosadas con un único huevo en su interior. Apertura genital ventral, inmediatamente posterior al acetábulo, siendo visible en los trematodos montados lateralmente. Receptáculo seminal de mayor ancho respecto al ovario y con forma de garrote. Las glándulas vitelinas se organizan en pequeños conglomerados de glándulas, alternándose irregularmente a lo largo del intestino. La cola es espatulada y levemente más ancha que el resto del cuerpo. El huevo es alargado, de coloración amarillo pálido, con forma de huso y uno de los extremos es más aguzado que el otro. Además, el huevo evidencia un aspecto colapsado en su cáscara.

Hospedero tipo: Mareca sibilatrix (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Hígado, riñón, y menos frecuente en corazón, pulmones, vesícula biliar.

Localidad tipo: Nebuco (región del Ñuble).

Otras localidades: Portezuelo, Chillán (región del Ñuble).

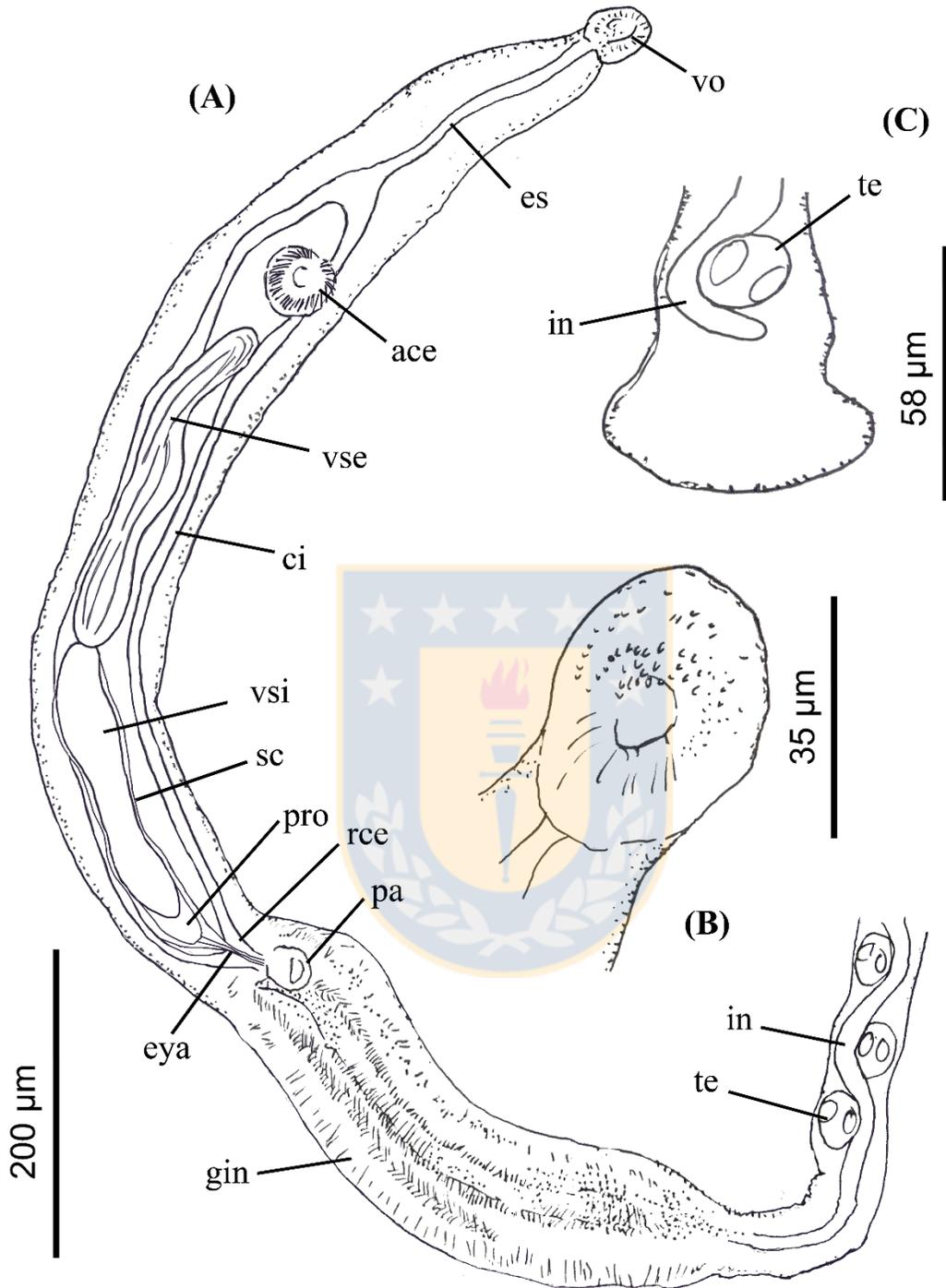


Figura 7. Macho de *Trichobilharzia* sp. 4 aislado desde el pato real (*Mareca sibilatrix*). (A) Segmento anterior del cuerpo y canal ginecóforo. (B) Ventosa oral espinosa. (C) Cola espatulada. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; es= esófago; eya= ducto eyaculador; gin= canal ginecóforo; in= intestino; pa= papila genital; pro= región prostática; rce= reunión cecal; sc= saco del cirro; te= testículo; vo= ventosa oral; vse= vesícula seminal externa; vsi= vesícula seminal interna.

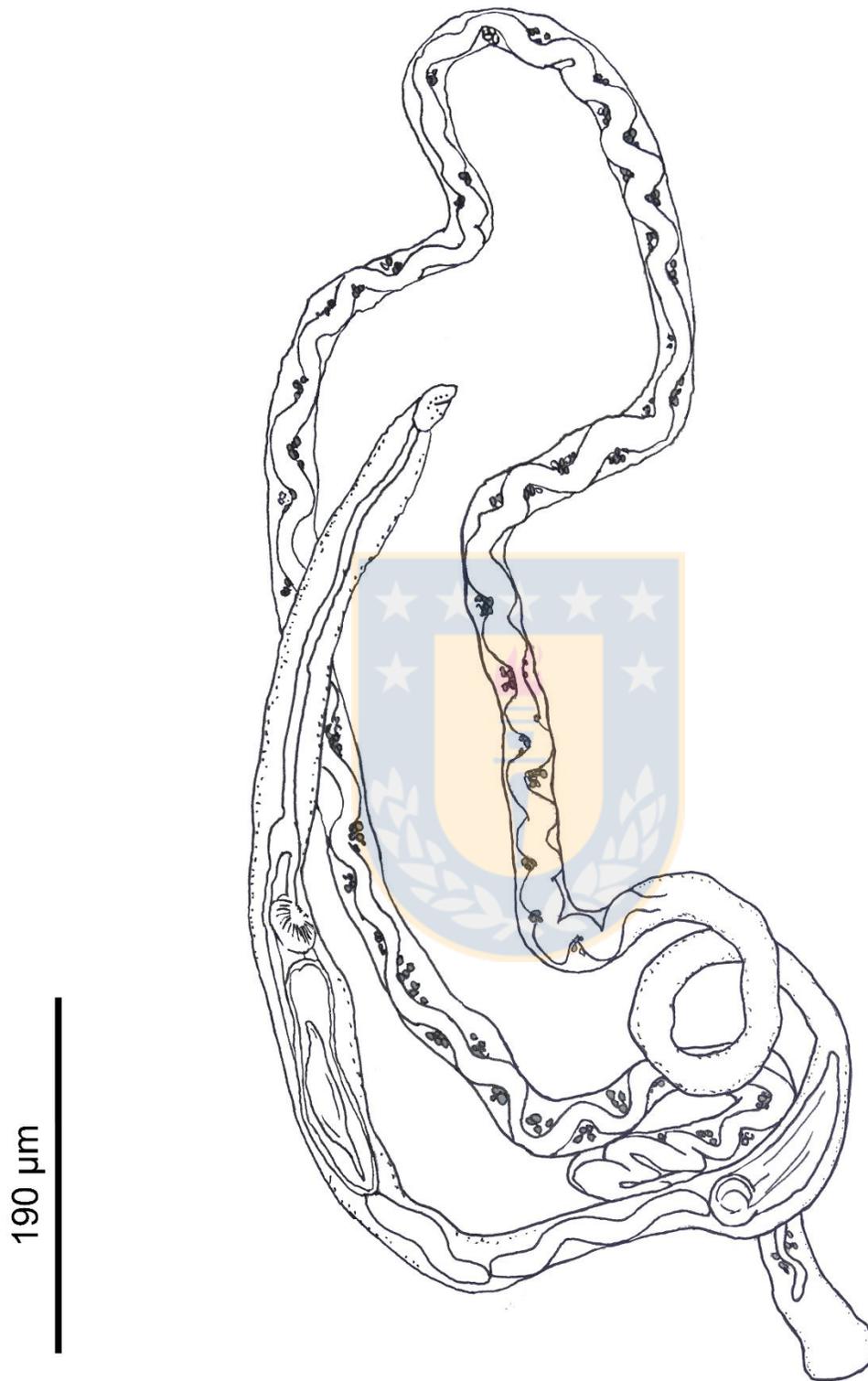


Figura 8. Hembra de *Trichobilharzia* sp. 4 *in toto* aislado desde el pato real (*Mareca sibilatrix*).

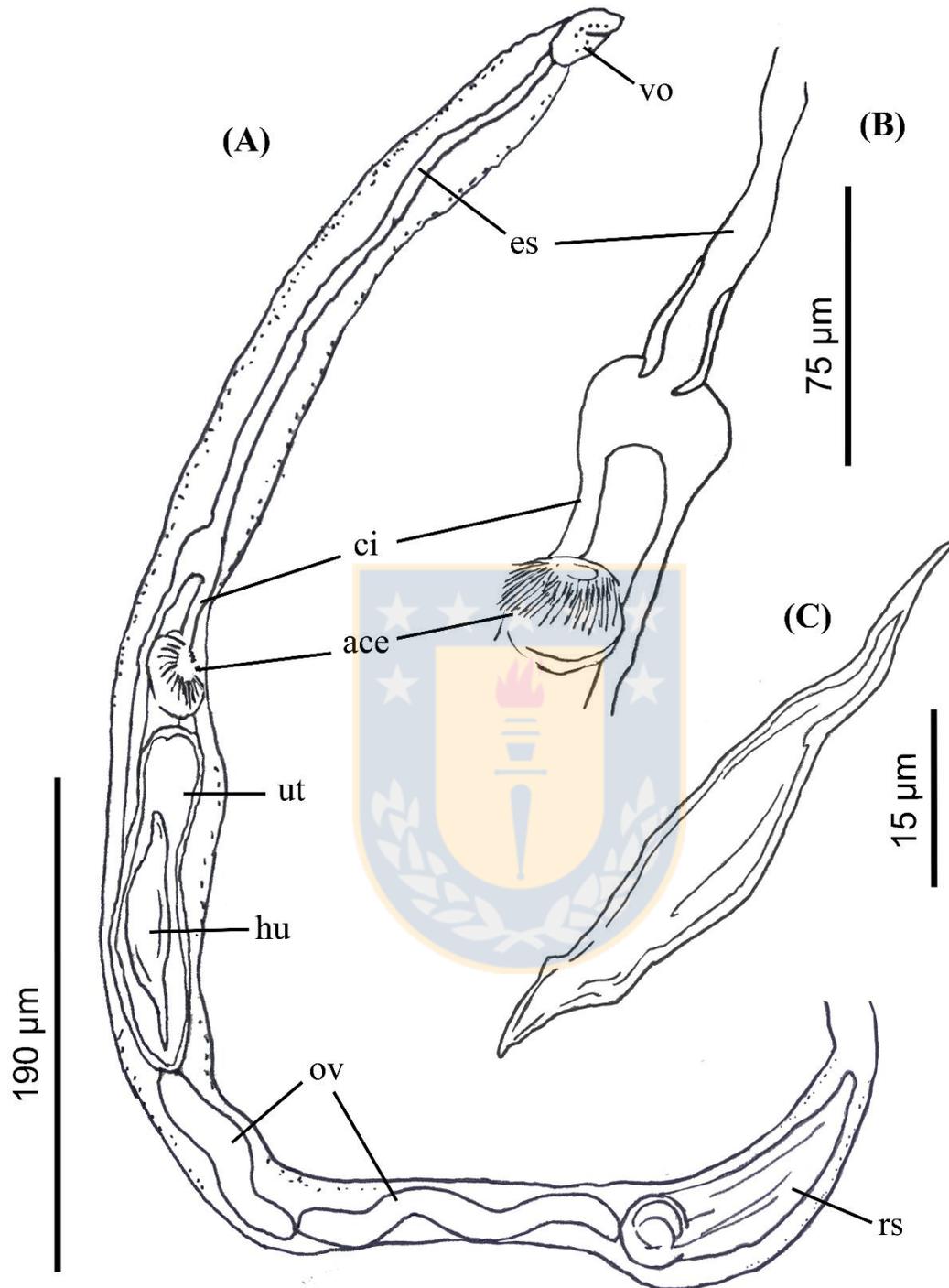


Figura 9. Detalles hembra de *Trichobilharzia* sp. 4 aislado desde el pato real (*Mareca sibilatrix*). (A) Detalle del extremo anterior del cuerpo, detallándose el sistema reproductivo. (B) Detalle de esófago y su división cecal. (C) Huevo observado *in utero*, levemente colapsado. Abreviaturas: ace= acetábulo; ci= ciego intestinal; es= esófago; hu= huevo; ov= ovario; rs= receptáculo seminal; ut= útero; vo= ventosa oral.

e. *Trichobilharzia querquedulae* McLeod, 1937

Descripción. *Macho* (Figuras 10-11, Tablas 3, 7): Vermes largos, levemente aplanados dorso-ventralmente, cuerpo robusto en toda su extensión. Ventosa oral redondeada, terminal, cubierta densamente por pequeñas espinas, aunque aquellas ubicadas en el borde anterior de la apertura oral son de mayor ancho y redondeadas. Esófago ancho, presentando un bulbo evidente, redondeado anterior al acetábulo, además se evidencia cómo los extremos de la pared del esófago se introducen dentro del bulbo. A continuación, de este bulbo se bifurcan dos ciegos delgados que pasan lateral al acetábulo y vesícula seminal hasta reunirse posterior a la región prostática al nivel de la papila genital. Acetábulo redondeado, de diámetro similar a la ventosa oral, cubierto con espinas delgada y largas en torno a su apertura. Vesícula seminal contorsionada, sin segmentación visible, con marcadas estrías en su superficie. Saco del cirro pequeño, de pared delgada, estrechamente asociado al tercio distal de la vesícula seminal, además de abarcar a la región prostática y ducto eyaculador. Región prostática pequeña, fusiforme. Ducto eyaculador desemboca en el poro genital. Papila genital prominente, sin espinas, en extremo anterior del canal ginecóforo, ubicado en lado izquierdo de la línea media longitudinal de dicho canal. El canal ginecóforo es un surco cubierto de espinas diminutas densamente organizadas, de gran desarrollo muscular y ancho levemente mayor al segmento anterior del cuerpo. El primer testículo está a poca distancia del borde posterior del canal ginecóforo. El intestino pasa sinuoso entre los testículos. Se contabilizaron 179-207 testículos redondeados, pequeños, organizados en grupos de 2-3 testículos alternándose de forma irregular a lo largo del intestino hasta cerca de su extremo terminal. La cola es espatulada, con el intestino llegando muy cerca del borde la cola.

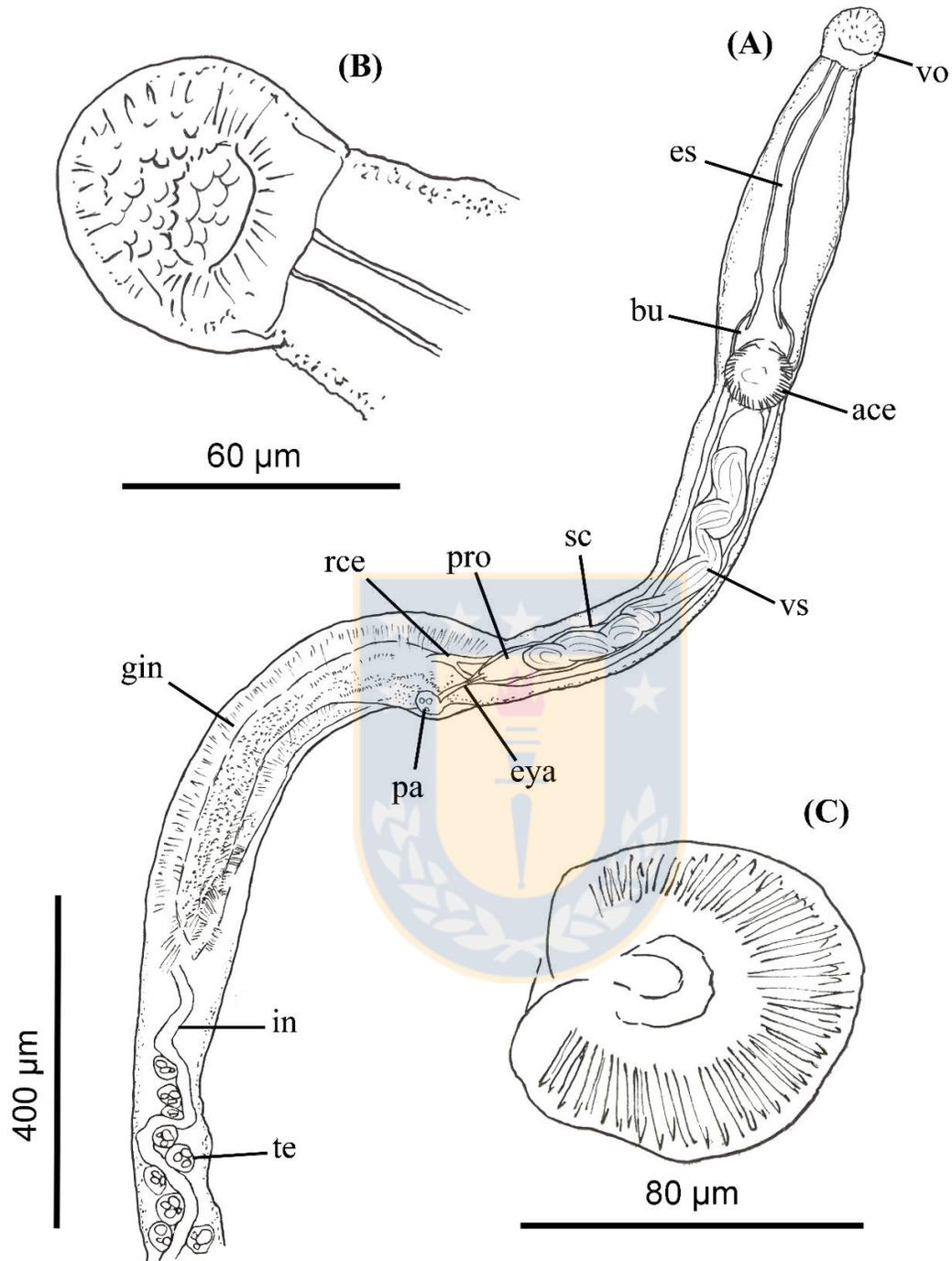


Figura 10. Macho de *Trichobilharzia querquedulae* aislado desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). (A) Segmento anterior, detallando canal ginecóforo. (B) Ventosa oral con espinas anchas. (C) Detalle de acetábulo, amplio, cubierto de espinas delgadas. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; es= esófago; eya= ducto eyaculador; gin= canal ginecóforo; in= intestino; pa= papila genital; pro= región prostática; rce= reunión cecal; sc= saco del cirro; te= testículo; vo= ventosa oral; vs= vesícula seminal.

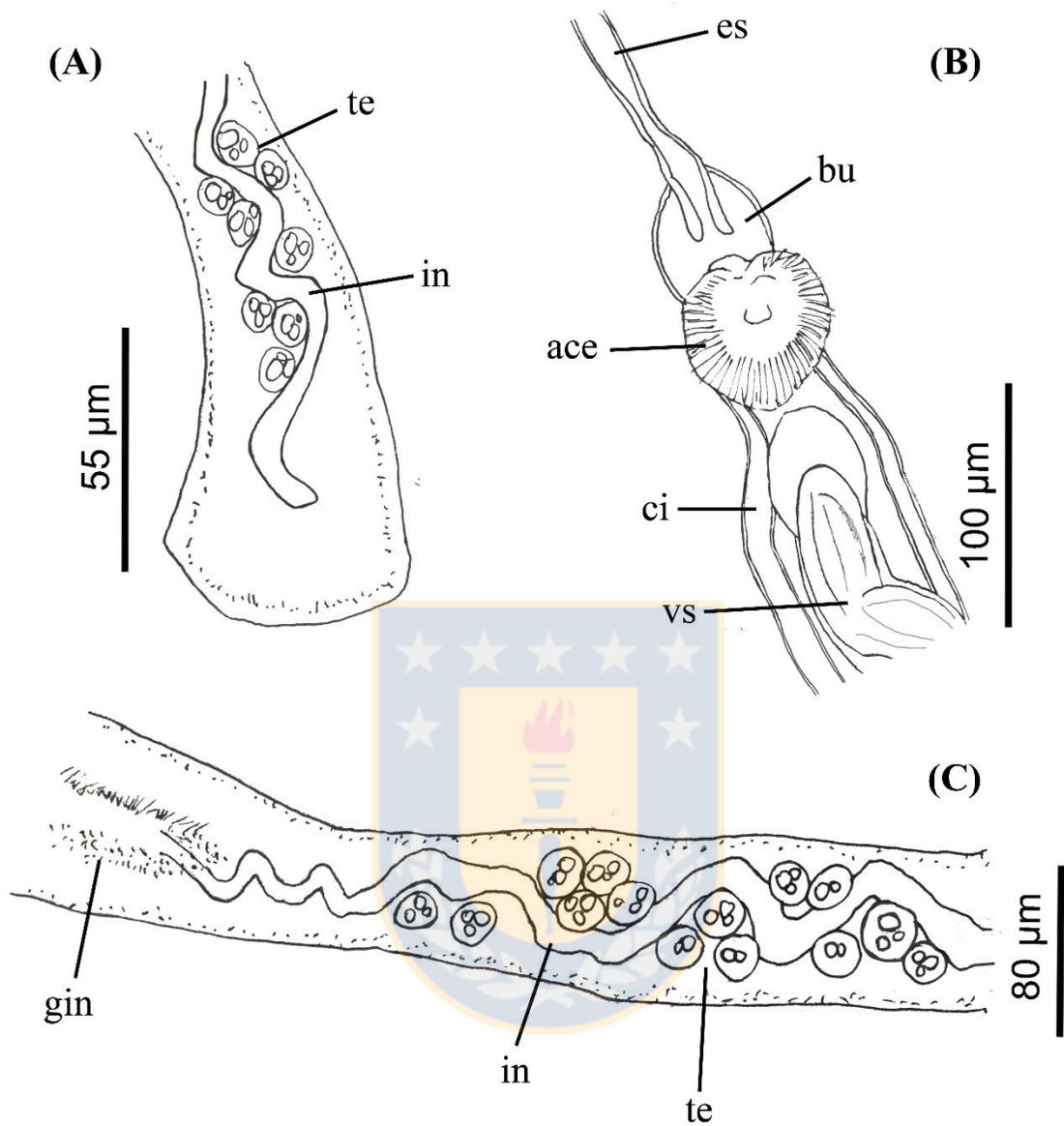


Figura 11. Detalles macho de *Trichobilharzia querquedulae* aislado desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). (A) Detalle de cola espatulada. (B) Región del acetábulo y donde el esófago se divide en los ciegos. (C) Región testicular, nótese la organización de los testículos. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; ci= ciego intestinal; es= esófago; gin= canal ginecóforo; in= intestino; te= testículo; vs= vesícula seminal.

Tabla 3. Mediciones de los esquistosomas viscerales pertenecientes al género *Trichobilharzia* aislados en el presente estudio, incluyendo otras especies relacionadas. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis.

Taxón	<i>Trichobilharzia</i> sp. 1	<i>Trichobilharzia</i> sp. 3	<i>Trichobilharzia physellae</i>	<i>T. physellae</i>		
Hospedero	<i>Anas flavirostris</i> (Anseriformes)	<i>Anas georgica</i> (Anseriformes)	<i>Columba livia</i> (Columbiformes)	<i>Aythya affinis</i> , <i>A. collaris</i> , <i>A. valisineria</i> , <i>Bucephala albeolata</i> , <i>Clangula hyemalis</i> , <i>Mergus merganser</i> (Anseriformes)‡		
Infección	M (n= 9)f Natural	M (n= 12)c, f Natural	H (n= 2)f Natural	M (n= 8)c Experimental	H (n= 8)c Experimental	M (n= 3)f Natural
País	Chile	Chile	Chile	USA	USA	USA
L total*	>4616	6120	>1717	1300-7500	4400	2600
L. VO	25-54 (40,44 \pm 10,28)	23.33-30 (27,08 \pm 2,47)	39-43 (41 \pm 2,83)	28-40	24-44	-
A. VO	16,67-41 (30,37 \pm 7,64)	15-21,67 (17,50 \pm 2,07)	21-23 (22 \pm 1,41)	24-28	24-28	-
L. Ace	23,33-52 (38,89 \pm 9,56)	18,33-28,33 (24,17 \pm 2,97)	27-35 (31 \pm 5,66)	-	-	-
D. Ace	23,33-51 (40,70 \pm 9,26)	18,33-28,33 (22,64 \pm 3,13)	29-30 (29,50 \pm 0,71)	16-32	24-32	-
d. OS-Ace	225-430 (314,22 \pm 64,24)	340-450 (385,83 \pm 33,15)	323-415 (369 \pm 65,05)	160-340	200-300	320
d. Ace-VS	13,33-68 (36,81 \pm 18,33)	3,33-20 (10,83 \pm 4,74)	-	-	-	-
L. VS	170-428 (291,78 \pm 87,66)	410-650 (557,50 \pm 75,93)	-	-	-	400
L. VSE	-	-	-	-	-	-
L. VSI	-	-	-	-	-	-

d. Ea-CG	487-1039 (789,89 ± 173,66)	920-1260 (1121,67 ± 110,19)	-	-	-	-
d. Ace-CG	340-380 (360 ± 28,28)	480-750 (640 ± 80,45)	-	140-340	-	440
L. CG	105-329 (224,26 ± 83,47)	170-231,67 (200,56 ± 20,65)	-	100-190	-	186
L. PG	6,67-23 (17,96 ± 5,78)	6,67-13,33 (9,86 ± 1,81)	-	-	-	-
A. PG	5-23 (17,19 ± 5,71)	6,67-13,33 (8,47 ± 2,07)	-	-	-	-
Re. cecal	Ace-VS	VS-CG	Nv	Ace-VS	post Rsem	Nv
d. CG-1° Te	24-106 (57,19 ± 27,55)	36,67-123,33 (55,28 ± 26,30)	-	16-26	-	-
n° Te*	>100	87	-	96-160	-	>100
L. Te	13,33-32 (22,49 ± 6,19)	15-31,67 (20,06 ± 4,07)	-	28	-	-
D. Te	13,33-29 (20,77 ± 5,01)	10-18,33 (13,28 ± 2,17)	-	32	-	25-30
L. Ut	-	-	259-288 (273,50 ± 20,51)	-	-	-
L. ovario	-	-	260-324 (292 ± 45,25)	-	90-200	-
L. Rsem	-	-	119-157 (138 ± 26,87)	-	-	-
d. Ace-ovario	-	-	272-290 (281 ± 12,73)	-	100-300	-
L. huevo	-	-	100-139 (119,50 ± 27,58)	-	170-250	180**
A. huevo	-	-	21-36 (28,50 ± 10,61)	-	65-80	70**
Forma huevo	-	-	Huso con espina	-	Huso con espina	-
Fijador utilizado	E80	E80	E80	Gi	Gi	E80

Tinción utilizada	AC	AC	AC	BC, AC	BC, AC	ACS
Referencia	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio	[1]	[1]	[2]

Tabla 3. (continuación)

Taxón	<i>Trichobilharzia</i> sp. 4		<i>Trichobilharzia jequitibaensis</i>		<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	<i>T. querquedulae</i>		<i>T. querquedulae</i>
Hospedero	<i>Mareca sibilatrix</i> (Anseriformes)		<i>Cairina moschata</i> (Anseriformes)		<i>Spatula cyanoptera</i> (Anseriformes)	<i>Spatula discors</i> (Anseriformes)		<i>Spatula discors</i> , <i>Spatula cyanoptera</i> , <i>Spatula clypeata</i> (Anseriformes)‡
Infección	M (n= 14)c, f Natural	H (n= 3)c Natural	M (n= 20) Natural	H (n= 15) Natural	M (n= 11)c Natural	M (n= ?)c Natural	H (n= ?)c Experimental	M (n= 3)f Natural
País	Chile	Chile	Brasil	Brasil	Chile	Canadá	Canadá	USA
L total*	3130-4320 (3666,67 ± 434,59)	3859-4187 (4025 ± 164,04)	5,87-10,63 (8,14) mm	7,23-12,92 (9,74) mm	3714-5941 (5088,38 ± 739,37)	3600	1860	4800
L. VO	18,33-33,33 (27,14 ± 3,84)	26-38 (32,33 ± 6,03)	39-61 (52)	37-53 (47)	56-77 (62,91 ± 5,92)	-	-	-
A. VO	15-23,33 (19,52 ± 2,30)	16-25 (21 ± 4,58)	37-59 (46)	33-53 (41)	47-60 (52,64 ± 4,13)	-	34	-
L. Ace	18,33-26,67 (22,38 ± 3,05)	29-33 (31,33 ± 2,08)	33-62 (50)	39-59 (45)	58-79 (69,82 ± 6,38)	-	-	-
D. Ace	18,33-30 (24,05 ± 2,90)	27-37 (31,33 ± 5,13)	46-66 (56)	35-53 (46)	50-79 (63,91 ± 11,75)	73§	36	-
d. OS-Ace	300-450 (358,57 ± 39,97)	253-346 (289 ± 49,93)	273-551 (396)	266-558 (339)	308-433 (337,91 ± 33,49)	274-375	250	417
d. Ace-VS	5-46,67 (17,26 ± 10,08)	-	-	-	12-62 (34,91 ± 17,56)	37§	-	-
L. VS	200-400 (330,71 ± 58,50)†	-	-	-	285-552 (407,55 ± 92,77)	412§	-	325
L. VSE	140-310 (236,43 ± 50,17)	-	-	-	-	-	-	-

L. VSI	60-160 (120 ± 33,47)	-	-	-	-	-	-	-
d. Ae-CG	670-1040 (802,86 ± 105,28)	-	719-1289 (956)	-	805-1307 (955,36 ± 142,70)	678	-	-
d. Ace-CG	290-490 (389,29 ± 70)	-	309-678 (456)	-	429-671 (514,27 ± 71,40)	-	-	400
L. CG	208,33-416,67 (279,88 ± 57,70)	-	399-772 (559)	-	360-491 (420,36 ± 33,50)	375§	-	225
L. PG	8,33-15 (12,86 ± 2,57)	-	-	-	17-33 (25,45 ± 4,97)	-	-	-
A. PG	8,33-13,33 (10,95 ± 1,93)	-	-	-	12-28 (22,36 ± 4,95)	-	-	-
Re. cecal	VS-CG	Nv	VS-CG	prox Rsem	VS-CG	VS-CG	post Ov	Nv
d. CG-1° Te	10-70 (40,12 ± 14,89)	-	-	-	53-128 (89 ± 27,53)	-	-	-
n° Te*	60-79	-	96-145	-	127-180	210-240	-	>200
L. Te	16,67-28,33 (21,61 ± 2,98)	-	26-62 (46)	-	28-36 (31,35 ± 2,78)	-	-	-
D. Te	11,67-25 (16,72 ± 3,02)	-	29-65 (41)	-	17-28 (21,60 ± 2,66)	-	-	18-23
L. Ut	-	147-193 (173,67 ± 23,86)	-	-	-	-	-	-
L. Ov	-	171-271 (215,67 ± 50,85)	-	292-558 (430)	-	-	120	-
L. Rsem	-	95-118 (110,33 ± 13,28)	-	99-154 (123)	-	-	-	-
d. Ace-Ov	-	155-193 (177,67 ± 20,03)	-	263-512 (360)	-	-	170	-
L. huevo	-	102-118 (110,67 ± 8,08)	-	172-242 (225)¥	-	-	217	150**
A. huevo	-	21-40 (32,67 ± 10,21)	-	59-89 (67)¥	-	-	76	35**
Forma huevo	-	Huso con espina	-	Huso con espina	-	-	Huso con espina	-

Fijador utilizado	E80	E80	Gi	Gi	E80	ACa	Bou	E80
Tinción utilizada	AC	AC	TriG	TriG	AC	AC	HDe, AC	ACS
Referencia	Presente estudio	Presente estudio	[3]	[3]	Presente estudio	[4]	[5]	[2]

Abreviaturas y símbolos: A= ancho; Ace= acetábulo; CG= canal ginecóforo; D= diámetro; d= distancia; L= longitud; Ov= ovario; PG= papila genital; Re= reunión; Rsem= receptáculo seminal; Te= testículo; Ut= útero; VO= ventosa oral; VS= vesícula seminal; VSE= vesícula seminal externa; VSI= vesícula seminal interna; Nv= no visto; post Rsem= posterior a receptáculo seminal; prox Rsem= extremo proximal receptáculo seminal; post Ov= posterior al ovario; c= mediciones en base a trematodos completos; f= mediciones en base a fragmentos de trematodos; *En el caso de no coleccionar los vermes completos se indicó el mayor valor registrado junto al símbolo mayor que (>); **Huevos colectados desde material fecal, no se caracterizaron hembras; †Para esta especie la vesícula seminal está dividida en dos. En esta se indica la longitud total de dicho órgano; ‡No se detallaron los hospederos de los cuales se describieron los vermes, no obstante, los autores citan estas aves como hospederas de dicho esquistosoma en su estudio; §Medida indicada solo en trematodos inmaduros; ¥Huevos medidos en solución salina; ?= información no detallada por autores. Fijadores: ACa= solución de ácido acético-corrosivo caliente; Bou= solución de picro-formol de Bouin; E80= etanol 80%; Gi= fluido de Gilson a 60°C. Tinciones: AC= alum carmín; ACS= acetocarmín de Semichón; BC=bórax carmín; TriG= tricrómico de Gomori; HDe= hematoxilina de Delafield. Referencias: [1] McMullen y Beaver (1945); [2] Brant y Loker (2009); [3] Leite *et al.* (1978); [4] McLeod (1937); [5] McLeod y Little (1942).

Tabla 4. Mediciones obtenidas en cada uno de los esquistosomas nasales pertenecientes al género *Trichobilharzia*, incluyendo el aislado en el presente estudio. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis.

Taxón	<i>Trichobilharzia</i> sp. 2	<i>Trichobilharzia</i> <i>nasicola</i>	<i>Trichobilharzia</i> <i>spinulata</i>	<i>Trichobilharzia</i> <i>duboisii</i>	<i>Trichobilharzia</i> <i>australis</i> †	<i>Trichobilharzia</i> <i>arcuata</i> †	<i>Trichobilharzia</i> <i>regenti</i> †
Hospedero	<i>Anas flavirostris</i> (Anseriformes)	<i>Anas undulata</i> (Anseriformes)	<i>Alopochen aegyptiaca</i> , <i>Plectropterus gambensis</i> (Anseriformes)	<i>Nettapus auritus</i> (Anseriformes)	<i>Anas superciliosa</i> (Anseriformes)	<i>Dendrocygna arcuata</i> (Anseriformes)	<i>Anas platyrhynchos</i> , <i>Cairina moschata</i> (Anseriformes)
n	M (n= 1)f	M (n=?)	M (n=?)	M (n= 2)f	M (n= 17)c, f	M (n= 6)c, f	M (n= 30)f
Infección	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Experimental
País	Chile	Ruanda	Ruanda	Ruanda	Australia	Australia	República Checa
L. total*	>5752	12-19 mm	15-21 mm	>2.2 mm	11,1 ± 3,8 mm	12,6 ± 3,5 mm	>5,22 mm
L. VO	40	38-46	38	38	40 ± 5	40 ± 1	39 ± 4
A. VO	35	30-38	34	33	30 ± 4	30 ± 1	32 ± 5
L. Ace	38	40-47	45	46	-	40 ± 1	34 ± 6
A. Ace	36	35-41	38	34	30 ± 6	30 ± 1	29 ± 6
d. OS-Ace	452	385-475	350-450	350	380 ± 40	400 ± 90	333 ± 73
Re cecal	Nv	VSE-VSI	VSE-VSI	VSE-VSI	VS-CG	VSE-VSI	VS-CG
d. Ace-VS	Nv	-	-	30	-	-	-
L. VSE	Nv	200-250	120-220	155	140 ± 30	90 ± 10	140 ± 34
L. VSI	Nv	250-340	146-219	210	200 ± 50	190 ± 50	104 ± 23
d. Ae-CG	1068	1000-1300	700-875	-	-	-	-
L. CG	246	300-350	250-325	410-420	200 ± 30	170 ± 40	280 ± 29
L. PG	18	-	-	-	20 ± 5	-	15 ± 1
A. PG	19	-	-	-	-	-	-
d. CG-1° T	40	-	-	-	250 ± 90	-	58 ± 11
n° Te*	>100	170-200	233	>42	161-243	88-127	>120
L. Te**	20-29 (24,50 ± 2,61)	-	-	-	20 ± 3	20-30 ± 6	39 ± 8
A. Te**	18-24	30	35-45	22-35	30 ± 9	20 ± 4	28 ± 8

Fijador utilizado	(21,60 ± 1,54) E80	?	?	?	Sa	Sa	F4
Tinción utilizada	AC	?	?	?	CGo, HM, PiG	CGo, HM, PiG	TriG, H&E
Referencia	Presente estudio	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]

Tabla 4. (continuación)

Taxón	<i>Trichobilharzia novaeseelandiae</i>	<i>Trichobilharzia rodhaini</i>	<i>Trichobilharzia aureliani</i>
Hospedero	<i>Aythya novaeseelandiae</i> (Anseriformes)	<i>Bostrychia hagedash</i> (Pelecaniformes)	<i>Podiceps cristatus</i> , <i>Tachybaptus ruficollis</i> (Podicipediformes)
n	M (n= 2)c, f	M (n= 1)f	M (n= ?)
Infección	Natural	Natural	Natural
País	Nueva Zelanda	Ruanda	Ruanda
L. total*	3,5-5,8 mm	>6 mm	16-17 mm
L. VO	35-40	46	40
A. VO	30-35	33	36
L. Ace	30-42,5	-	39
A. Ace	35-40	40	41
d. OS-Ace	420-470 (445)	285	366-500
Re cecal	VS-CG	VSE-VSI	Nv
d. Ace-VS	-	-	40-55
L. VSE	185-190	130	130-150
L. VSI	235-275	230	250-300
d. Ae-CG	1050-1100 (1075)	700	750-1000
L. CG	200-210 (205)	219	230-275
L. PG	-	-	-
A. PG	-	-	-

d. CG-1° T	-	-	-
n° Te*	>180	>137	125
L. Te**	-	30	20
A. Te**	21-27,5 (25)	35	30
Fijador utilizado	ET, F	?	?
Tinción utilizada	AC	?	?
Referencia	[7]	[1]	[2]

Abreviaturas y símbolos: M= trematodos macho; n= número trematodos medidos; c= vermes completos medidos; f= fragmentos de vermes medidos; Nv= No observado; A= ancho; Ace= acetábulo; CG= canal ginecóforo; D= diámetro; d= distancia; Ea= extremo anterior; L= longitud; PG= papila genital; Re= reunión; Te= testículo; Ut= útero; VO= ventosa oral; VS= vesícula seminal; VSE= vesícula seminal externa; VSI= vesícula seminal interna; *En el caso de que los vermes no fueron colectados completos, se indicó el mayor valor registrado junto al símbolo mayor que (>); c= mediciones en base a trematodos completos; f= mediciones en base a fragmentos de trematodos; **se midieron 20 testículos; †valores expresados como media y desviación estándar; ?= información no detallada por autores.

Fijadores: E80= etanol 80%; ET= etanol sin concentración detallada; F= formaldehído sin concentración detallada; F4= formaldehído 4%; Sa= solución salina; AC= alum carmín. Tinciones: CGo=carmín de Gower; HM= hemalumbre de Meyer con eosina; H&E= hematoxilina-eosina; PiG= picro-Gomori; TriG= tricrómico de Gomori. Referencias: [1] Fain (1955); [2] Fain (1956); [3] Fain (1959); [4] Blair e Islam (1983); [5] Islam (1986); [6] Horák *et al.* (1998); [7] Davis *et al.* (2022).

Entre las características observadas en el MEB (Figuras 12-13), se puede mencionar un tegumento cubierto por múltiples espinas pequeñas, las cuales se alternan con estructuras similares a papilas de mayor diámetro, las cuales se distribuyen desde la ventosa oral hasta la cola, alternándose en el tegumento de forma irregular. El canal ginecóforo está revestido en toda su superficie por espinas triangulares alargadas, las cuales son de mayor longitud en el segmento inicial del canal, para luego ir reduciendo gradualmente su tamaño. Así mismo, en el borde del canal ginecóforo se observaron estructuras tipo papilas, con varias de ellas en el área de la papila genital. El tegumento ventral del canal ginecóforo presenta un aspecto corrugado con pliegues profundos en toda su extensión, para luego retomar el aspecto espinoso del resto del cuerpo (Figura 12). La ventosa oral presenta espinas triangulares de gran tamaño en el borde anterior de la apertura bucal, las cuales se dirigen hacia dicha apertura. En el borde dorsal como en el borde anterior de dicha ventosa se observan múltiples papilas circumorales, de morfología similar a las del resto del tegumento. En el acetábulo, el cual se observa retraído, se observan múltiples espinas largas sobre su superficie (Figura 13).

Hospedero: Spatula cyanoptera (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Hígado, riñón, intestino delgado, y menos frecuente en corazón, pulmones, vesícula biliar, mucosa colon y ciegos, serosa molleja y cavidad celómica.

Localidad: Nebuco (región del Ñuble).

4.2.2. *Nasubilharzia* Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021

a. *Nasubilharzia melancorhypha* Flores, Viozzi, Casalins, Loker y Brant, 2021

Descripción. *Macho* (Figuras 14-15, Tablas 5, 7): Vermes filamentosos, largos, levemente aplanado dorso-ventralmente, cuerpo totalmente cubierto de pequeñas espinas. Ventosa oral cónica, terminal, cubierta con pequeñas espinas en su superficie. Esófago presenta un pequeño bulbo de forma cónica, anterior al acetábulo, del cual se bifurcan dos ciegos delgados que pasan lateral al acetábulo y vesícula seminal. No se logró observar la anastomosis de los dos ciegos. Acetábulo ovalado de mayor diámetro respecto a la ventosa oral, en torno a su apertura se observan múltiples espinas alargadas y delgadas. La vesícula seminal es marcadamente contorsionada y no se observa una segmentación de la misma. La región prostática es pequeña y ovalada, mientras que en algunos especímenes se mostró

arriñonada. Ducto espermático desemboca en el poro genital. La papila genital es prominente, se ubica en el lado izquierdo de la línea media longitudinal del canal, anterior al inicio del canal ginecóforo y posee múltiples espinas pequeñas organizadas en torno al poro genital. El canal ginecóforo es de gran longitud, pudiendo superar hasta cuatro veces la longitud del segmento anterior del cuerpo. Este tiene múltiples espinas pequeñas en su borde, sin embargo, carece de cualquier espina en su surco, siendo reemplazadas por una serie de bandas engrosadas (18-20 bandas) que dan origen a espacios huecos de formas cuadradas a rectangulares a lo largo del canal. Intestino es delgado y pasa sinuoso entre los testículos. El primer testículo aparece a corta distancia del borde posterior del canal ginecóforo. El verme de mayor longitud, aunque incompleto, presentó 102 testículos redondeados, pequeños, alternándose de forma irregular a los lados del intestino. El último testículo está cerca del extremo posterior del intestino. Se encontró un segmento de cola el cual presentó una forma espatulada, con el intestino llegando cerca del borde posterior.

Hospedero: Cygnus melancoryphus (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Mucosa nasal.

Localidad: Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter (región de Los Ríos), San Fabián (región del Ñuble).

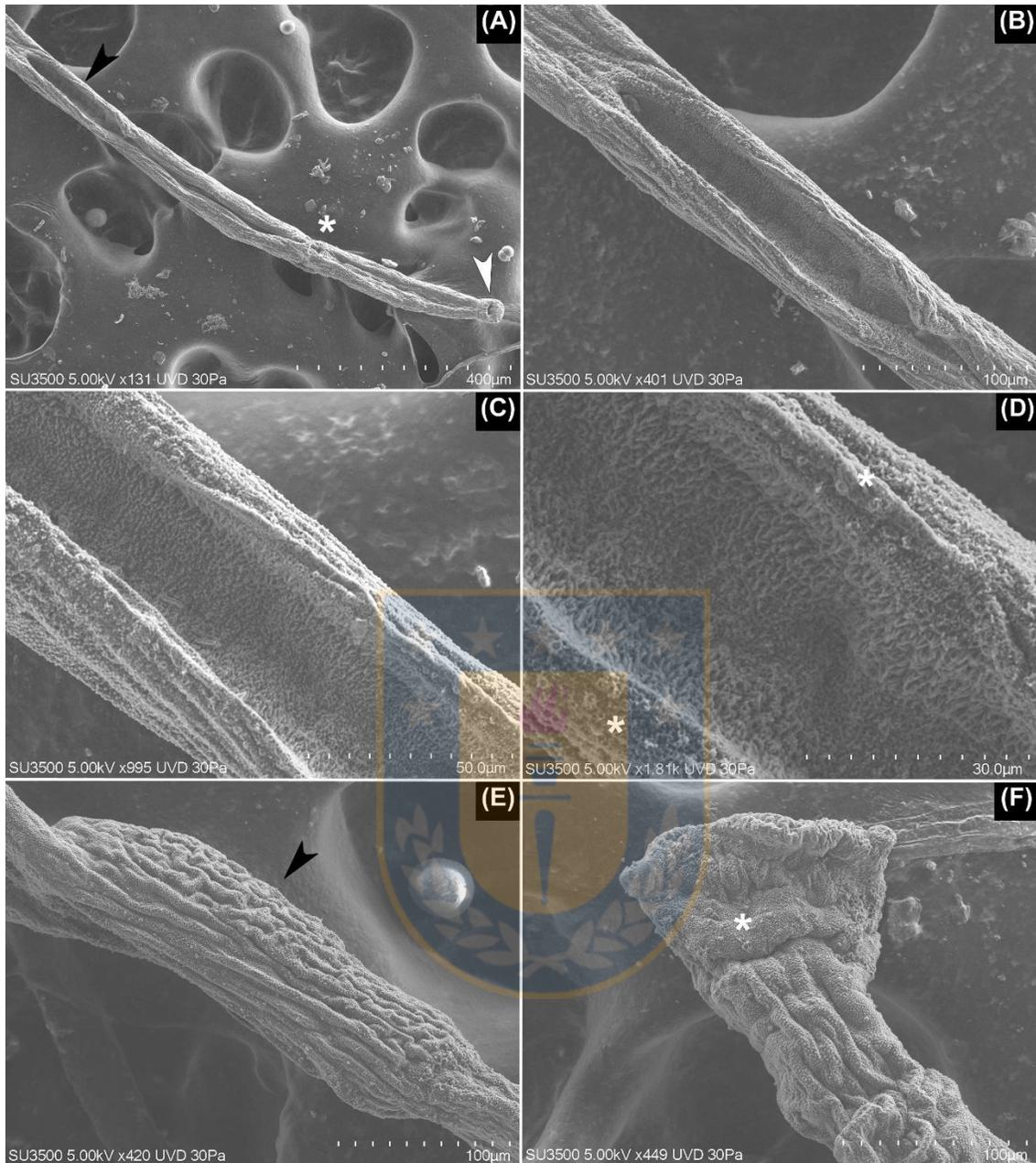


Figura 12. Imágenes MEB del trematodo *Trichobilharzia querquedulae*, donde se observan detalles del tegumento en diferentes secciones de los vermes. (A) Vista general del extremo anterior del cuerpo, donde se pueden ubicar la ventosa oral (cabeza de flecha blanca), acetábulo (asterisco) y canal ginecóforo (cabeza de flecha negra). (B-D) detalle del canal ginecóforo el cual está densamente cubierto de pequeñas espinas alargadas. Además, es notoria la presencia de papilas en los bordes del canal (D). (E) Lado dorsal del canal ginecóforo, caracterizado por un tegumento marcadamente plegado sobre sí mismo (cabeza de flecha), a diferencia del resto del tegumento. (F) Cola espatulada cuyo tegumento está cubierto de múltiples espinas pequeñas y estructuras tipo papila (asterisco).

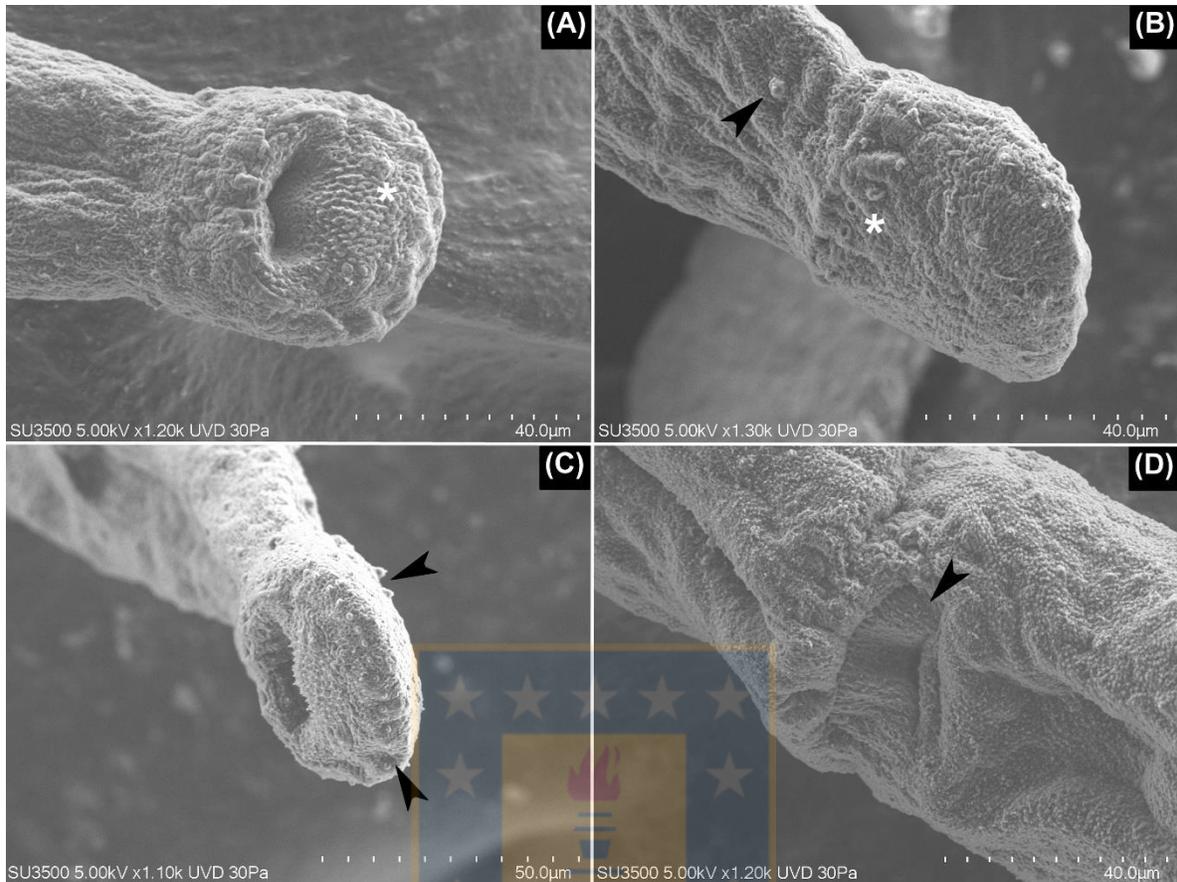


Figura 13. Imágenes MEB del trematodo *Trichobilharzia querquedulae*, donde se observan detalles de las ventosas de los vermes. (A-C) Ventosa oral con sus pequeñas espinas típicas, aunque las que están en torno a la apertura oral son triangulares y dirigidas hacia el interior de ésta (asterisco) (A). (B) Lado dorsal de la ventosa oral, donde son evidentes las papilas en la base de esta (asterisco) como en el tegumento inmediatamente posterior (cabeza de flecha). (C) Presencia de papilas circumorales, de posición levemente antero-dorsal. (D) Acetábulo retraído, donde se pueden visualizar algunas de las espinas que están en torno a su apertura (cabeza de flecha).

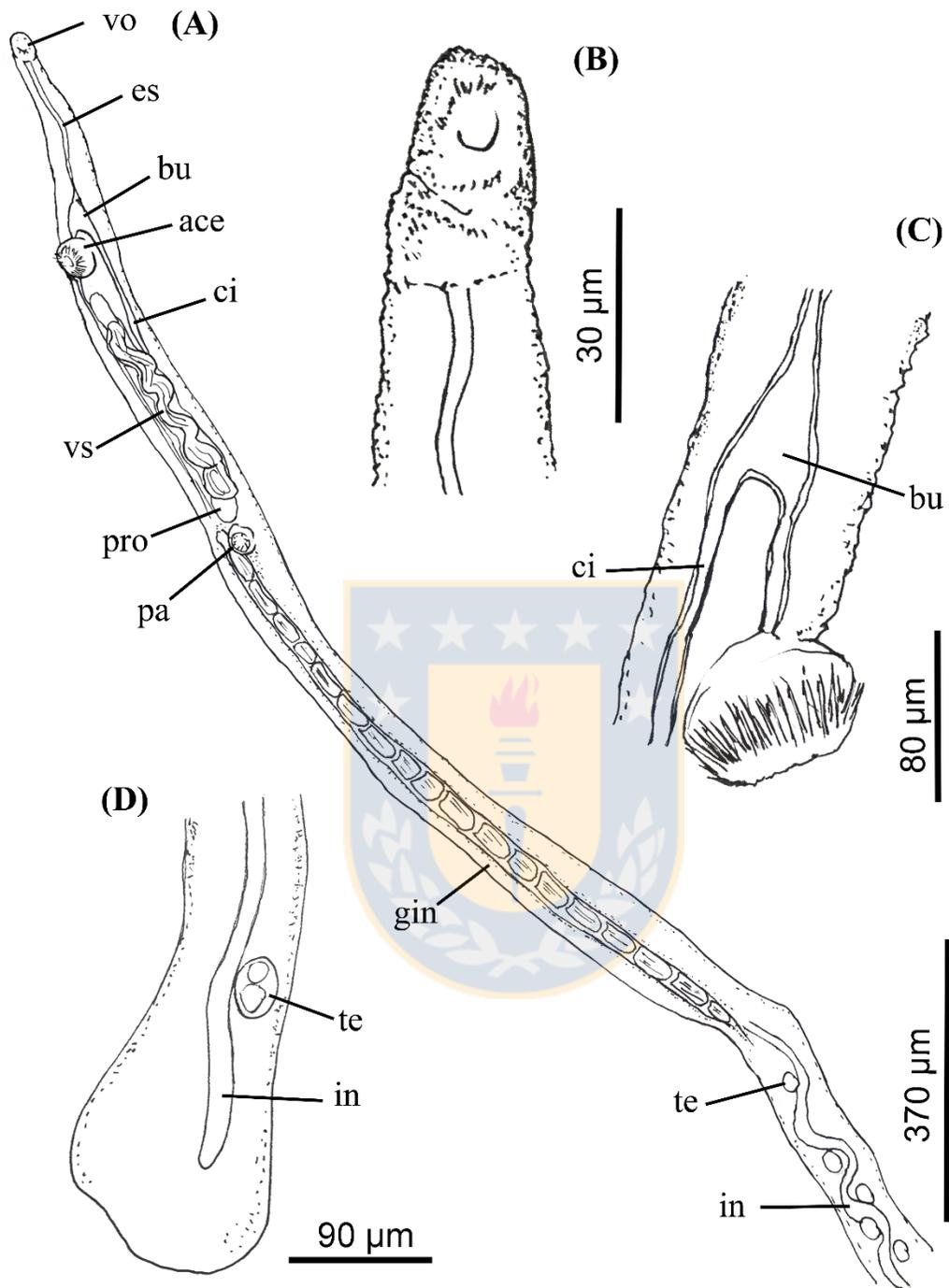


Figura 14. Macho de *Nasusbilharzia melancorhypha* aislado desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). (A) Segmento anterior del cuerpo donde está detallado además su particular canal ginecóforo. (B) Detalle de ventosa oral espinosa. (C) Área de bifurcación cecal y acetábulo. (D) Detalle de cola semi-espatulada. Abreviaturas: ace= acetábulo; bu= bulbo; ci= ciego intestinal; es= esófago; eya= ducto eyaculador; gin= canal ginecóforo; in= intestino; pa= papila genital; pro= región prostática; te= testículo; vo= ventosa oral; vs= vesícula seminal.

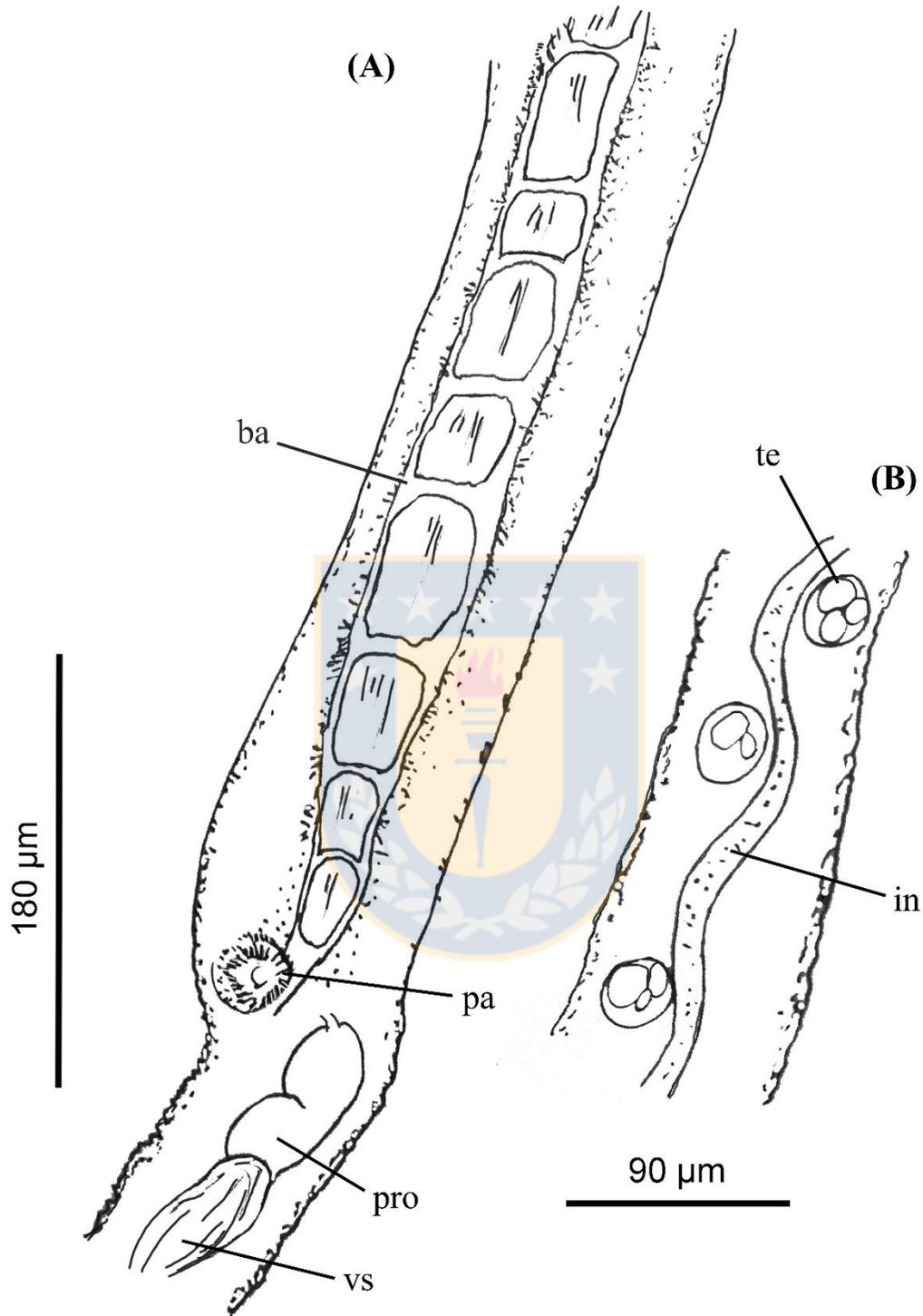


Figura 15. Macho de *Nasusbilharzia melancorhypha* aislado desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). (A) Detalle de primer tercio de canal ginecóforo típico de este género. (B) Detalle de organización de testículos e intestino en el cuerpo. Abreviaturas: ba= banda engrosada; in= intestino; pa= papila genital; pro= región prostática; te= testículo; vs= vesícula seminal.

Tabla 5. Mediciones de *Nasubilharzia melancorhypha* aislados desde la mucosa nasal del cisne de cuello negro. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis.

Taxón	<i>Nasubilharzia melancorhypha</i>	
	<i>Cygnus melancoryphus</i>	<i>Cygnus melancoryphus</i>
Hospedero	M (n= 21)f	M (n= 19)c, f
Infección	Natural	Natural
País	Chile	Argentina
L total*	>11110	10,2 mm
L. VO	23,33-33,33 (28,58 \pm 2,82)	24-34
A. VO	16,67-26,67 (21,67 \pm 2,86)	22-36
L. Ace	21,67-38,33 (33,17 \pm 4,59)	26-48
A. Ace	16,67-28,33 (22,67 \pm 3,17)	24-43
d. OS-Ace	330-490 (414,50 \pm 40,06)	230-365
d. Ace-VS	3,33-53,33 (15,75 \pm 11,74)	5-24
L. VS	200-440 (312 \pm 63,63)	168-312
d. Ea-CG	690-1140 (902 \pm 104,51)	-
d. Ace-CG	270-650 (397 \pm 84,11)	-
L. CG	558,33-1030 (705,59 \pm 124,28)	730-2160
L. PG	10-18,33 (14,76 \pm 2,25)	-
A. PG	10-18,33 (12,70 \pm 2,61)	31-48
d. CG-1° Te	20-56,67 (37,78 \pm 10,87)	-
n° Te*	>102	130
L. Te	13,33-30 (20,61 \pm 4,73)	17
A. Te	10-28,33 (17,23 \pm 4,67)	29
n° bandas canal	17-22	17-20
L. huevo**	-	215-291
A. huevo	-	34-56
Forma huevo	-	Huso
Fijador utilizado	E80	F5
Tinción utilizada	AC	CCl, TriG
Referencia	Presente estudio	[1]

Abreviaturas y símbolos: M= trematodos macho; n= número trematodos medidos; c= vermes completos medidos; f= fragmentos de vermes medidos; A= ancho; Ace= acetábulo; CG= canal ginecóforo; d= distancia; Ea= extremo anterior; L= longitud; PG= papila genital; Re= reunión; Rsem= receptáculo seminal; Te= testículo; Ut= útero; VO= ventosa oral; VS= vesícula seminal; *En el caso de no colectar vermes completos se indicó el mayor valor registrado junto al símbolo mayor que (>);**huevos colectados directamente desde la mucosa nasal. Fijadores: E80= etanol 80%; F5= formaldehído 5% caliente. Tinciones: AC= alum carmín; CCl= carmín clorhídrico; TriG= tricrómico de Gomori. Referencias: [1] Flores *et al.* (2021).

4.2.3. *Dendritobilharzia* Skrjabin y Zakharow, 1920

a. *Dendritobilharzia* sp. 1

Descripción *Macho* (Figuras 16-17, Tablas 6-7): Cuerpo elongado, aplanado dorsoventralmente, sin espinas en tegumento, aunque cubierto de finas estrías longitudinales y transversales, no hay presencia de ventosas ni canal ginecóforo. Extremos anterior y posterior aguzados. El cuerpo está claramente dividido en la distribución de sus órganos; en el primer tercio se encuentran la mayoría de los órganos reproductivos y digestivos, y en los otros dos tercios están los testículos e intestino. Apertura oral pequeña, ventral, subterminal. Esófago recto, excepto en su último tercio donde presenta una curvatura, paredes recubiertas externamente por glándulas esofágicas pequeñas en toda su extensión, no obstante, estas se concentran alrededor de la apertura oral y en el área de la bifurcación cecal. Junto a la curvatura del esófago, en el lado derecho, de posición ventral, se observa una pequeña depresión del tegumento denominada “fosa”. Los ciegos son profundamente ramificados en su extremo proximal para luego limitarse a unas escasas ramificaciones superficiales. A continuación, los ciegos se reúnen posterior a la vesícula seminal para formar un ciego común o intestino. Se observan algunas glándulas bordeando la pared de los ciegos en su extensión. Vesícula seminal contorsionada, ubicada en el área intercecal. Ducto eyaculador delgado. No se observó presencia del saco del cirro. Cirro romo, no armado, de posición ventro-lateral y poro genital, ubicados en lado derecho del cuerpo, levemente posterior a la unión cecal. El cirro presenta una forma lacunar rodeada de estructuras similares a glándulas. El intestino es ramificado (“dendrítico”), presentando el primer divertículo intestinal a la altura del cirro para luego continuar zigzagueando hasta el extremo posterior del cuerpo. El primer testículo aparece a corta distancia posterior a la anastomosis de los ciegos. Los testículos son alargados y presentan lóbulos, se organizan densamente en el cuerpo, el intestino y sus divertículos intestinales pasando intrincadamente entre los testículos, sobrepasándolos lateralmente. Estas gónadas se presentan hasta el extremo posterior del cuerpo muy cerca del área de la vesícula excretora, la cual tiene aspecto de “V” para abrirse en un poro ovalado.

Hospedero tipo: *Anas georgica* (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Riñón, corazón.

Localidad tipo: Reloca (región del Ñuble).

Otras localidades: Nebuco (región del Ñuble).

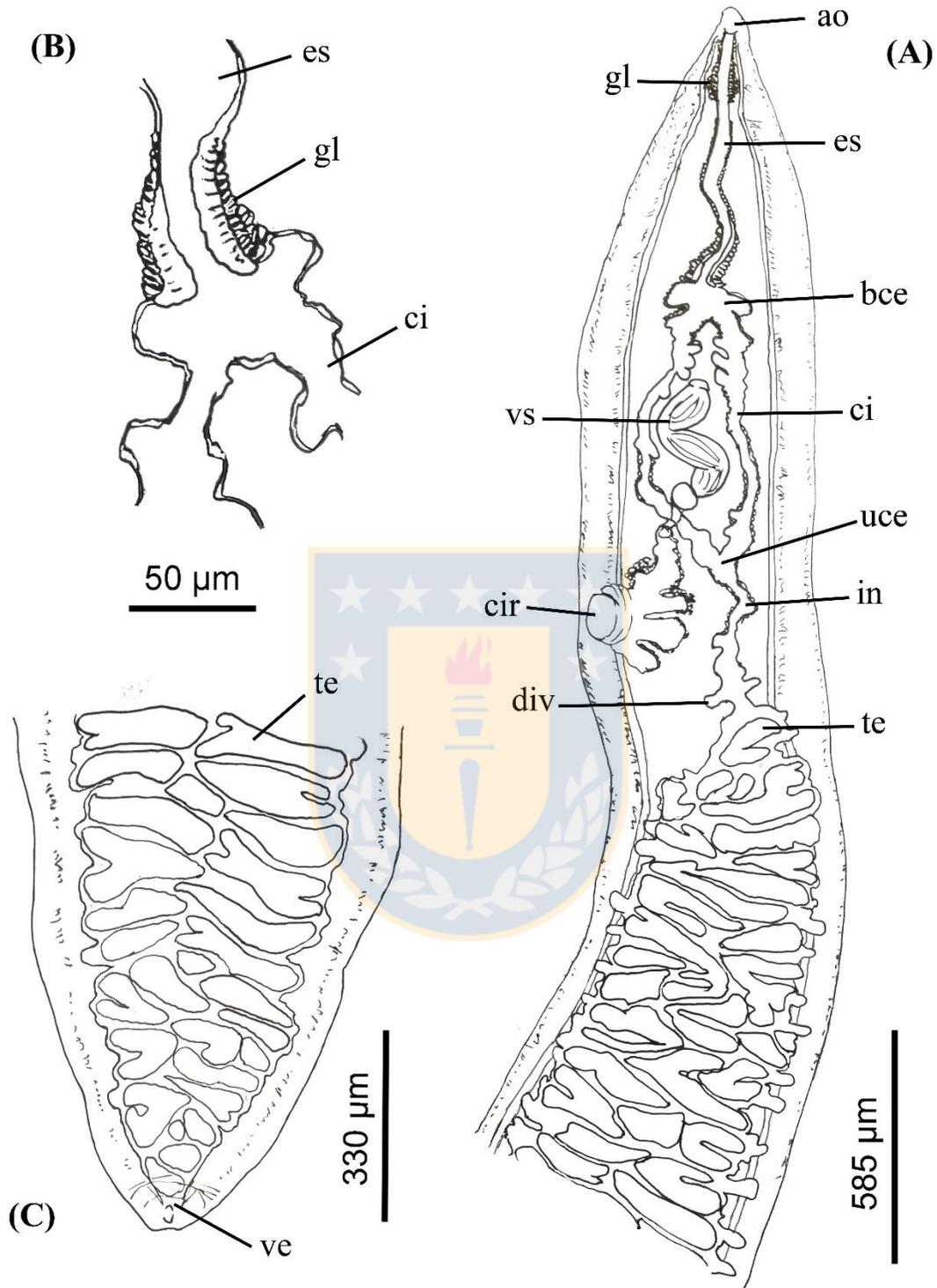


Figura 16. Macho de *Dendritobilharzia* sp. 1 aislado desde el pato jergón grande (*Anas georgica*). (A) Tercio anterior, y parte del segundo tercio, del cuerpo. (B) Detalle de bifurcación cecal. (C) Detalle de extremo posterior del cuerpo. Abreviaturas: ao= apertura oral; bce= bifurcación cecal; ci=

ciego intestinal; cir= cirro; div= divertículo intestinal; es= esófago; gl= glándulas esofágicas; in= intestino; te= testículo; uce= unión cecal; ve= vesícula excretora; vs= vesícula seminal.

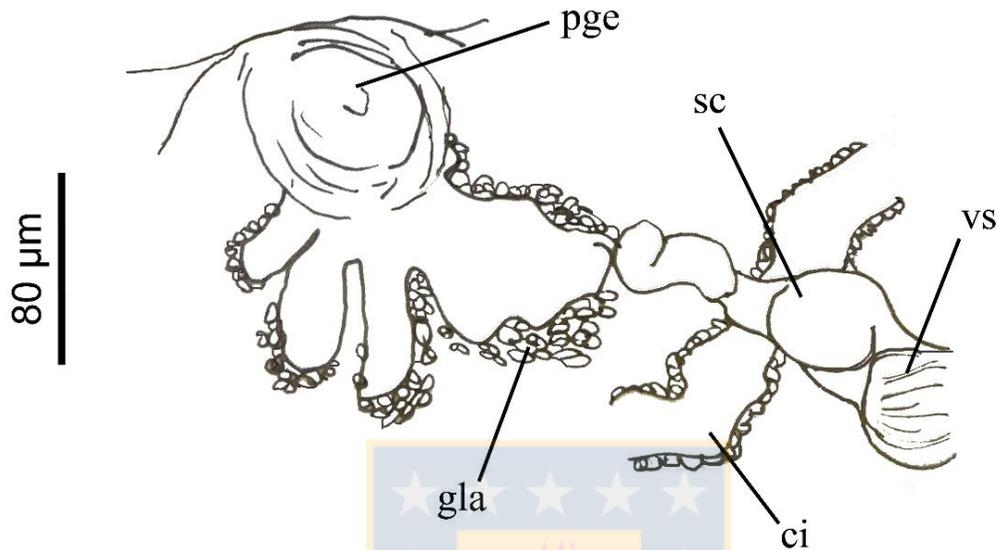


Figura 17. Aparato genital del macho de *Dendritobilharzia* sp. 1 aislado desde el pato jergón grande (*Anas georgica*). Abreviaturas: ci= ciego intestinal; gla= estructuras glandulares; pge= poro genital; sc= saco del cirro; vs= vesícula seminal.

b. *Dendritobilharzia* sp. 2

Descripción *Macho* (Figura 18, Tablas 6-7): Cuerpo elongado, aplanado dorsoventralmente, sin espinas en tegumento, aunque cubierto de finas estrías longitudinales y transversales, no hay presencia de ventosas ni canal ginecóforo. El cuerpo está notoriamente dividido según la distribución de sus órganos, en el primer tercio se encuentran la mayoría de los órganos reproductivos y digestivos, y en los otros dos tercios están los testículos e intestino. Apertura oral pequeña, ventral, subterminal. Esófago recto en toda su extensión, no se visualiza la presencia de glándulas esofágicas. Ciegos se originan tras bifurcación cecal, presentando ramificaciones profundas en su primer tercio para luego transformarse a ramificaciones superficiales. Los ciegos se reúnen en la unión cecal, para originar el intestino de tipo “dendrítico”, que presenta su primer divertículo intestinal al nivel del cirro. Vesícula seminal levemente contorsionada, ubicándose en el área intercecal. No se observó saco del cirro. Cirro pequeño, romo, no armado ventro-lateral, ubicado en lado

izquierdo del cuerpo, posterior a unión cecal. El primer testículo aparece a corta distancia, posterior al primer divertículo intestinal y al cirro. Testículos ovalados y algunos pequeños circulares, sin lobulaciones, se organizan densamente en el cuerpo, y los divertículos intestinales los sobrepasan lateralmente. Verme montado está incompleto por lo que no se pudo caracterizar su vesícula excretora ni extensión de intestino y testículos.

Hospedero tipo: Anas flavirostris (Aves: Anatidae)

Sitio de infección: Corazón y cavidad celómica.

Localidad tipo: Reloca (región del Ñuble)



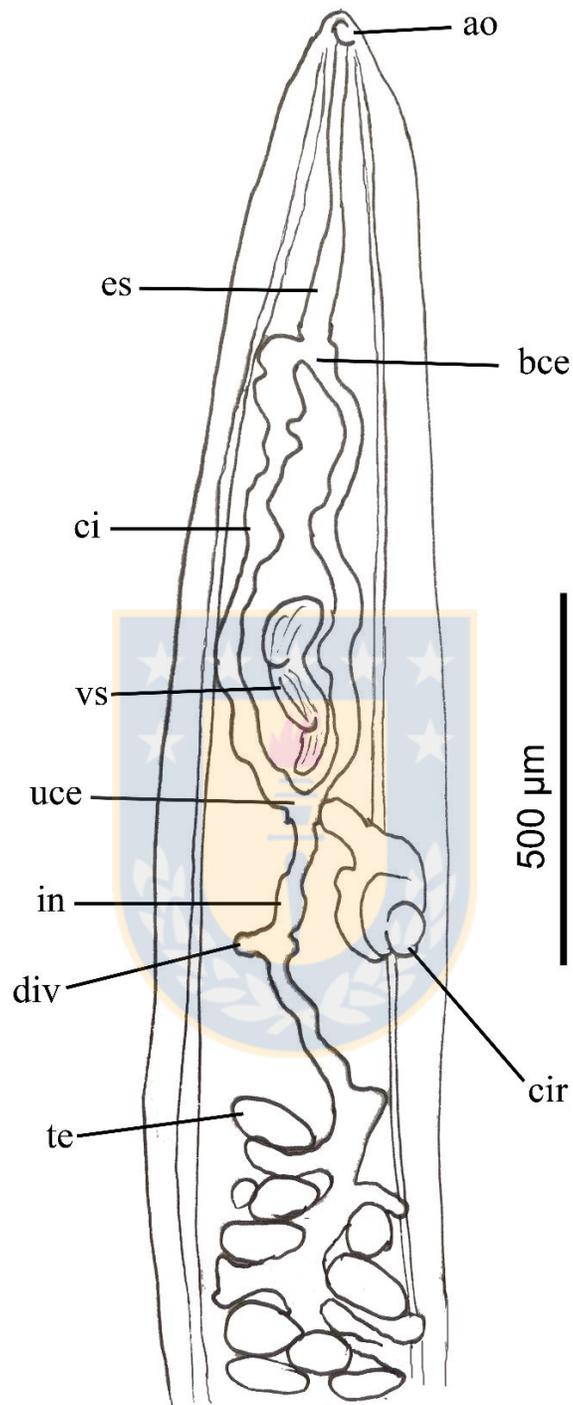


Figura 18. Tercio anterior del cuerpo de macho de *Dendritobilharzia* sp. 2 aislado desde el pato jergón chico (*Anas flavirostris*). Abreviaturas: ao= apertura oral; bce= bifurcación cecal; ci= ciego intestinal; cir= cirro; div= divertículo intestinal; es= esófago; in= intestino; te= testículo; uce= unión cecal; vs= vesícula seminal.

Tabla 6. Mediciones de los diferentes taxones de *Dendritobilharzia* aislados en el presente estudio, incluyendo otras especies relacionadas. Medidas en μm , a menos que se detalle lo contrario. Valores expresados como rango, seguido de promedio y desviación estándar entre paréntesis.

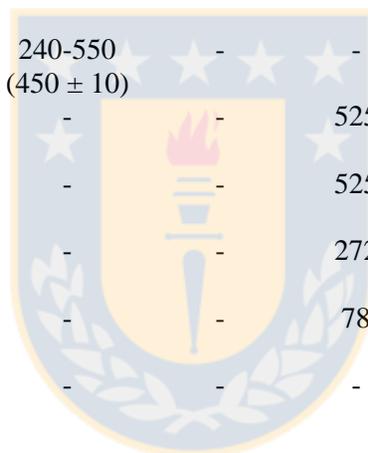
Taxón	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 1	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 2	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 3		<i>Dendritobilharzia</i> sp. 4	
Hospedero	<i>Anas georgica</i> (Anseriformes)	<i>Anas flavirostris</i> (Anseriformes)	<i>Spatula cyanoptera</i> (Anseriformes)	<i>Mareca sibilatrix</i> (Anseriformes)	<i>Cygnus melancoryphus</i> (Anseriformes)	
n	M (n= 2)	M (n= 1)	H (n= 1)	H (n= 1)	M (n= 1)	H (n= 2)
Infección	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural
País	Chile	Chile	Chile	Chile	Chile	Chile
L. total	5000	4500	5910	3285	7225	7886
A. cuerpo	480-577 (528,50 \pm 68,59)	413	939	584	681	626-818 (722 \pm 135,76)
L. esófago	604-656 (630 \pm 36,77)	497	721	623	753	749-766 (757,50 \pm 12,02)
d. Ea-bCe	638-663 (650,50 \pm 17,68)	513	762	635	759	782-818 (800 \pm 25,46)
d. bCe-In	587-764 (675,50 \pm 125,16)	577	979	1489	1311	1629-1726 (1677,50 \pm 68,59)
d. Ea-In	1225-1427 (1326 \pm 142,84)	1090	1741	2124	2070	2447-2508 (2477,50 \pm 43,13)
L. VS	262-499 (380,50 \pm 167,58)	220	-	-	633	-
d. Ea-pg	1417-1537 (1477 \pm 84,85)	1192	-	-	1799	-
Lado pg	Derecha	Derecha	-	-	Derecha	-
L. cirro	129-145 (137 \pm 11,31)	151	-	-	195	-
A. cirro	82-123 (102,50 \pm 28,99)	112	-	-	131	-
d. Ea-1° Te	1684-1833 (1758,50 \pm 105,36)	1286	-	-	2241	-
n° Te	>73-82**	>40**	-	-	108	-

L. testículos	134-237 (190,55 ± 31,99)	103-183 (140,67 ± 27,53)	-	-	136-225 (173 ± 19,80)	-
d. Ea-pu	-	-	506	520	-	524-578 (551 ± 38,18)
L. Ov	-	-	354	385	-	387-477 (432 ± 63,64)
A. Ov	-	-	516	291	-	371-390 (380,50 ± 13,44)
L. Resem	-	-	220	210	-	231-268 (249,50 ± 26,16)
A. Resem	-	-	133	140	-	91-101 (96 ± 7,07)
L. Ut§	-	-	919	756	-	820-859 (839,50 ± 27,58)
A. Ut	-	-	463	298	-	416
d. Ea-Ut	-	-	501	846	-	946-980 (963 ± 24,04)
d Ea-inicio Vi	-	-	1861	1917	-	2321-2372 (2346,50 ± 36,06)
D huevos	-	-	22-31 (26,56 ± 3,39)	22,50-26,50 (24,60 ± 1,60)	-	41-52 (46,20 ± 4,66)
Forma huevo	-	-	Esférico	Esférico	-	Esférico
Fijador utilizado	E80	E80	E80	E80	E80	E80
Tinción utilizada	AC	AC	AC	AC	AC	AC
Referencia	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio

Tabla 6. (continuación).

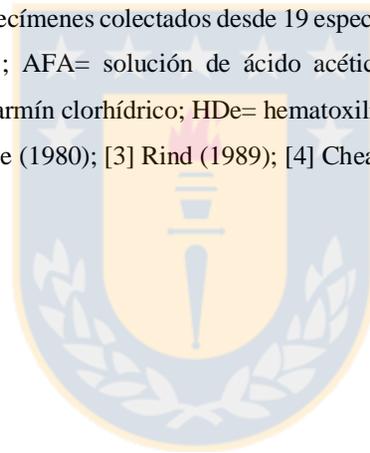
Taxón	<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>		<i>D. pulverulenta</i>		<i>D. pulverulenta</i> †		<i>D. pulverulenta</i> †		<i>Dendritobilharzia rionegrensis</i>	
Hospedero	<i>Spatula discors</i> (Anseriformes)‡		<i>Anas superciliosa, Anas rhynchotis, Anas platyrhynchos, Aythya novaeseelandiae, Tadorna variegata, Cygnus atratus</i> (Anseriformes)		<i>Anas platyrhynchos</i> (Anseriformes)		<i>Cairina moschata</i> (Anseriformes)		<i>Fulica rufifrons</i> (Gruiformes)	
n	M (n= 100)	H (n= 72)	M (n= 23)	H (n= 23)	M (n= 5)	H (n= 2)	M (n= 9)	H (n= 9)	M (n= 8)	H (n= 7)
Infección	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural
País	USA	USA	Nueva Zelanda	Nueva Zelanda	USA	USA	Brasil	Brasil	Argentina	Argentina
L. total	2,95-13,30 (6,65 ± 1,53) mm	3,35-10,37 (6,73 ± 1,37) mm	7,3-10,4 (8,67 ± 0,74) mm	6-13,4 (9,84 ± 3,29) mm	6,2 mm	8 mm	4,51-7,19 (5,98) mm	4,61-7,43 (6,46) mm	5,65-6,95 (6,3) mm	7,5-9,5 (8,2) mm
A. cuerpo	400-1790 (1010 ± 300)	400-1650 (1000 ± 280)	1100-1900 (1470 ± 47)	900-2000 (1600 ± 80)	600-750	890-1010	590-940 (760)	510-1070 (840)	820-1200 (1040)	800-1000 (900)
L. esófago	370-910 (620 ± 160)	340-970 (690 ± 90)	560-880 (750 ± 5)	610-1200 (930 ± 110)	427	621	440-620 (520)	380-770 (570)	560-800 (646)	600-760 (696)
d. Ea-bCe	-	-	-	-	-	-	-	-	560-800 (646)	600-760 (696)
d. bCe-In	240-1470 (840 ± 250)	630-2290 (1380 ± 360)	-	-	1080	1550	380-630 (530)	940-1510 (1250)	590-700 (630)	2600-2700 (2660)
d. Ea-In	720-2280 (1350 ± 520)	980-2990 (2020 ± 490)	1400-2160 (1930 ± 29)	1880-3600 (2770 ± 220)	-	-	-	-	-	-
L. VS	110-520 (290 ± 90)	-	-	-	260	-	280-630 (430)	-	-	-
d. Ea-pg	510-1790 (1200 ± 250)	-	1300-2040 (1470 ± 23)	-	1200	-	1060-1620 (1360)	-	1300-1800 (1530)	-

Lado pg	Derecha/ Izquierda	-	Derecha	-	Derecha	-	Derecha	-	Derecha	-
L. cirro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. cirro	60-280 (150 ± 40)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d. Ea-1° Te	890-2450 (1650 ± 330)	-	1600-2200 (1970 ± 25)	-	-	-	-	-	-	-
n° Te	100-170	-	-	-	120-130	-	144-155	-	90-100	-
L. testículos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d. Ea-pu	-	150-480 (330 ± 70)	-	240-550 (450 ± 10)	-	-	-	220-420 (320)	-	280-350 (320)
L. Ov	-	150-610 (430 ± 100)	-	-	-	525	-	290-440 (370)	-	500-650 (586)
A. Ov	-	150-640 (390 ± 90)	-	-	-	525	-	-	-	90-100 (93)
L. Resem	-	80-310 (200 ± 50)	-	-	-	272	-	100-250 (180)	-	-
A. Resem	-	30-130 (90 ± 30)	-	-	-	78	-	40-100 (70)	-	-
L. Ut§	-	180-760 (480 ± 120)	-	-	-	-	-	-	-	-
A. Ut	-	170-610 (390 ± 100)	-	-	-	-	-	-	-	-
d. Ea-Ut	-	450-1340 (940 ± 230)	-	-	-	350	-	-	-	-
d Ea- inicio Vi	-	940-2950 (2000 ± 370)	-	1800-3400 (2710 ± 200)	-	-	-	-	-	-
D huevos	-	64	-	40-85	-	60-65	-	76	-	19-25 (22)
Forma huevo	-	-	-	Esférico	-	Esférico	-	Esférico	-	Esféricos



Fijador utilizado	AFA	AFA	Sa	Sa	?	?	?	?	ET	ET
Tinción utilizada	PaM, Vr	PaM, Vr	HDe	HDe	?	?	?	?	CCl	CCl
Referencia	[1]	[1, 2]	[3]	[3]	[4]	[4]	[5]	[5]	[6]	[6]

Abreviaturas y símbolos: M= trematodos macho; n= número trematodos medidos; A= ancho; Ace= acetábulo; bCe= bifurcación cecal; CG= canal ginecóforo; D= diámetro; d= distancia; Ea= extremo anterior; In= intestino; L= longitud; Ov= ovario; pg= poro genital; pu= poro uterino; Re= reunión; Rsem= receptáculo seminal; Te= testículo; Ut= útero; Vi= vitelaria; VO= ventosa oral; VS= vesícula seminal; *verme incompleto; **n° incompleto porque verme fue cortado previo a tinción para extracción de ADN; §excluyendo metratermo; †citado como *Dendritobilharzia anatinarum*, más tarde sinonimizado por Vande Vusse (1980) con *D. pulverulenta*; ‡Autores indican que las medidas se basan en especímenes colectados desde 19 especies de anátidos, aunque la mayoría se colectaron desde *S. discors*; ?= información no detallada por autores. E80= etanol 80%; AFA= solución de ácido acético-formaldehído-alcohol; Sa= solución salina; ET= etanol sin concentración señalada. Tinciones: AC= alum carmín; CCl= carmín clorhídrico; HDe= hematoxilina de Delafield; PaM= paracarmín de Mayer; Vr= verde rápido. Referencias: [1] Ulmer y Vande Vusse (1970); [2] Vande Vusse (1980); [3] Rind (1989); [4] Cheatum (1941); [5] Freitas y Costa (1972); [6] Martorelli (1981).



c. *Dendritobilharzia* sp. 3

Descripción *Hembra* (Figuras 19-21, Tablas 6-7): Cuerpo elongado, aplanado dorsoventralmente, sin espinas en tegumento, aunque cubierto de finas estrías longitudinales y transversales, no hay presencia de ventosas. Extremos anterior y posterior aguzados. El cuerpo está claramente dividido en la distribución de sus órganos, en primer tercio se encuentran la mayoría de los órganos reproductivos y digestivos, y en los otros dos tercios están la vitelario e intestino. Apertura oral pequeña, ventral, subterminal. Esófago recto, aunque se curva lateralmente en su último tercio junto a la apertura del metratermo, paredes recubiertas externamente por glándulas esofágicas pequeñas, particularmente concentradas alrededor de la apertura oral, segmento medio y en el área de la bifurcación cecal. Uno de los ciegos profundamente ramificado en algunos puntos de su extensión, mientras que el otro presenta ramificaciones superficiales. En el caso del espécimen de *M. sibilatrix*, los ciegos se observan plétóricos de contenido granuloso, no observándose con claridad las ramificaciones, pero sí varios pliegues en toda su extensión. A continuación, los ciegos se anastomosan posterior al ovario y receptáculo seminal para originar un ciego común o intestino. El útero, ovario, ootipo y receptáculo seminal son intercecales. El útero tiene forma de bobina con un metratermo muy desarrollado, curvado, ubicado en el lado derecho del cuerpo, el cual desemboca en el poro uterino a la altura del último tercio del esófago, presentando una serie de estructuras glandulares bordeando dicho poro. El ovario es macizo, enroscado sobre sí mismo y ubicado sobre la línea media longitudinal del cuerpo. El receptáculo seminal es pequeño y fusiforme con una pequeña constricción central, posterior al ovario y de ubicación levemente lateral a la línea media del cuerpo. Ambos órganos ubicados en el tercio posterior del espacio intercecal. El ootipo está entre el útero y ovario hacia el lado izquierdo del cuerpo, recibiendo por un lado al ducto vitelino que pasa por el lado izquierdo del ovario, originándose desde el área de la vitelario, y por otro lado recibe el pasaje uterino desde el mismo útero. Las glándulas vitelinas o vitelario se originan inmediatamente tras la unión cecal y se extienden hasta el borde posterior del cuerpo. El intestino es “dendrítico”, presentando múltiples divertículos en toda su extensión, continuando a forma de zigzag hasta muy cerca del extremo posterior del cuerpo. El primer divertículo intestinal está a la altura de la unión cecal. La vesícula excretora es pequeña y tiene forma de “V”, aunque en el caso particular de *M. sibilatrix* dicha vesícula es ovalada.

Los huevos son semi-esféricos, de paredes delgadas y coloración amarillo pálido, sin embargo, en el caso de *M. sibilatrix* se observaron algunos huevos con lo que parece ser una pequeña espina en uno de sus extremos (Figura 20B).

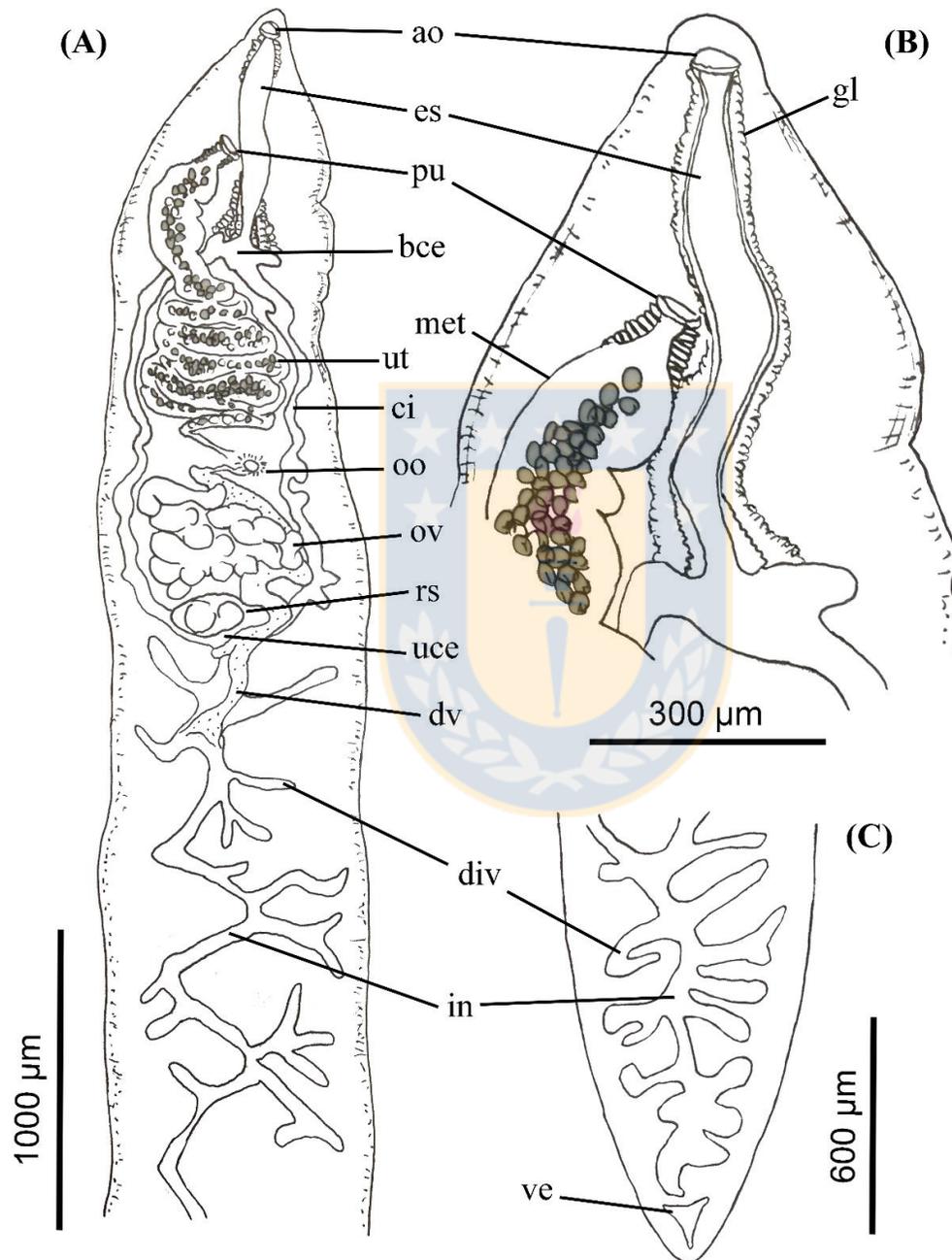


Figura 19. Hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3 aislada desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). (A) Tercio anterior, y parte del segundo tercio, del cuerpo, nótese los detalles del sistema reproductivo. (B) Detalle del área del poro uterino. (C) Cola aguzada del verme. Abreviaturas: ao=

apertura oral; bce= bifurcación cecal; ci= ciego intestinal; dv= ducto vitelino; div= divertículo intestinal; es= esófago; gl= glándulas esofágicas; in= intestino; met= metratermo; ov= ovario; pu= poro uterino; rs= receptáculo seminal; uce= unión cecal; ut= útero; ve= vesícula excretora.

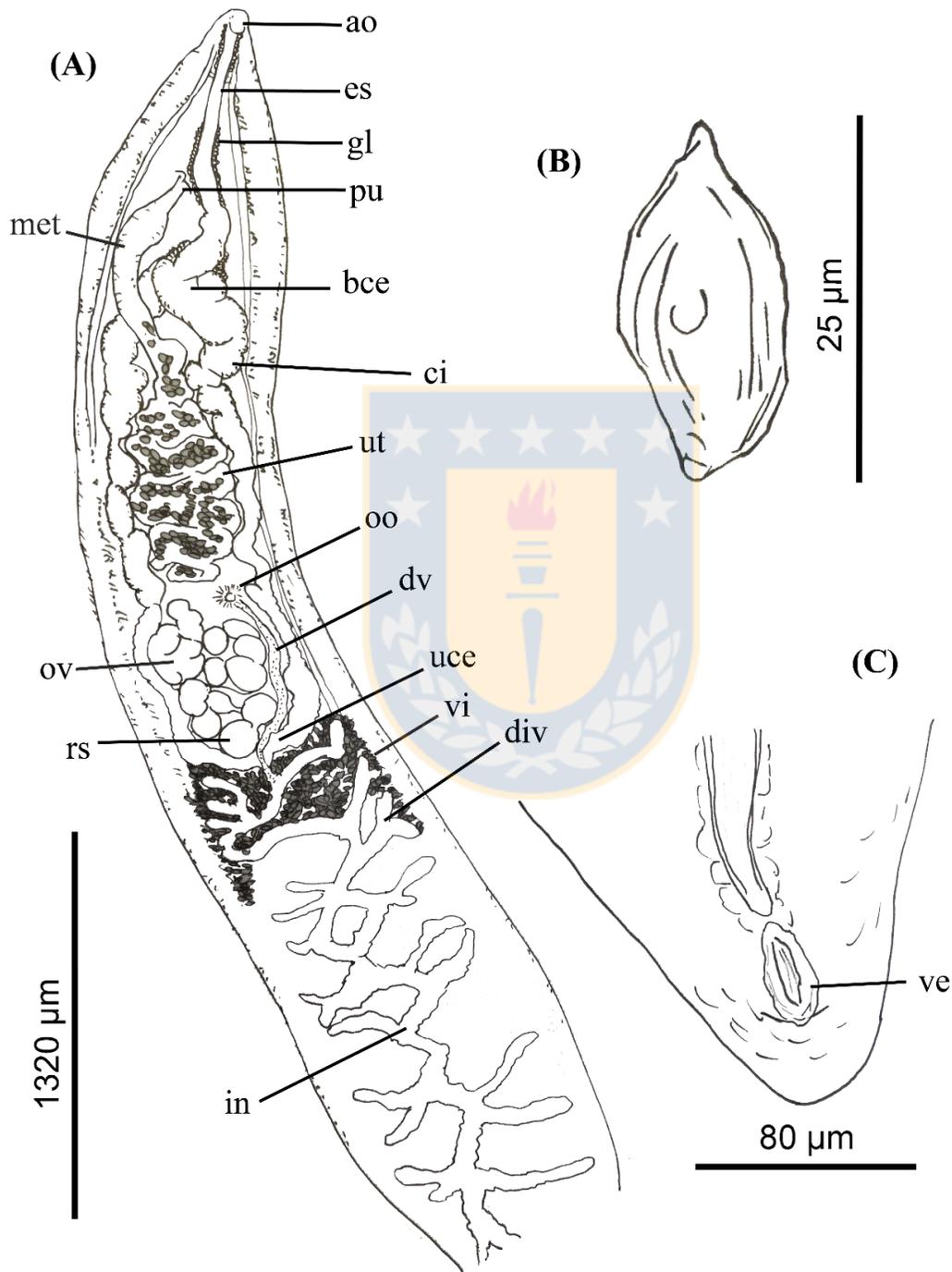


Figura 20. Hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3 aislada desde el pato real (*Mareca sibilatrix*). (A) Tercio anterior del cuerpo, y parte del segundo tercio. (B) Huevo con espina roma en un extremo. (C)

Punta de extremo posterior del cuerpo. Abreviaturas: ao= apertura oral; bce= bifurcación cecal; ci= ciego intestinal; div= divertículo intestinal; es= esófago; gl= glándulas esofágicas; in= intestino; met= metratermo; ov= ovario; pu= poro uterino; rs= receptáculo seminal; uce= unión cecal; ut= útero; ve= vesícula excretora; vi= vitelario.

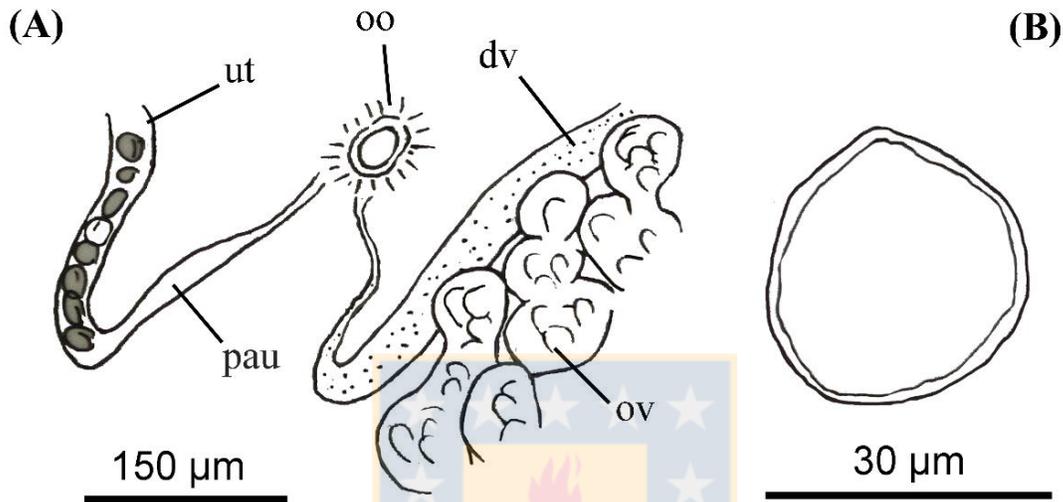


Figura 21. Parte del sistema reproductivo la hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3, aislada desde el pato colorado (*Spatula cyanoptera*). (A) Estructuras en torno al ootipo. (B) Huevo redondeado, típico del género. Abreviaturas: dv= ducto vitelino; oo= ootipo; ov= ovario; pau= pasaje uterino; ut= útero.

Hospedero tipo: *Spatula cyanoptera* (Aves: Anatidae).

Otros hospederos: *Mareca sibilatrix* (Aves: Anatidae).

Sitio de infección: Riñón, corazón.

Localidad tipo: Nebuco (región del Ñuble).

d. *Dendritobilharzia* sp. 4

Descripción Macho (Figura 22, Tablas 6-7): Cuerpo elongado, aplanado dorsoventralmente, sin espinas en el tegumento, aunque cubierto de finas estrías longitudinales y transversales, no hay presencia de ventosas ni canal ginecóforo. Extremo anterior aguzado y posterior redondeado. El cuerpo está claramente dividido en la distribución de sus órganos, en el primer tercio se encuentran la mayoría de los órganos reproductivos y digestivos, y en los otros dos tercios están los testículos e intestino. Apertura

oral pequeña, ventral, subterminal. Esófago recto, aunque curvado en la mitad de su extensión, paredes recubiertas externamente por glándulas esofágicas en toda su extensión y particularmente concentradas en el área de la bifurcación cecal. Junto a la curvatura del esófago, en el lado derecho, de posición ventral, se observa una pequeña depresión del tegumento denominada “fosa”. Los ciegos son superficialmente ramificados en toda su extensión, anastomosándose posterior al cirro para formar un ciego común o intestino. Vesícula seminal contorsionada, ubicada en la primera mitad del área intercecal, sobresaliendo de los límites de ésta, y desemboca en el saco del cirro. Saco del cirro redondeado, pequeño, ubicado en el lado derecho del cuerpo, junto al área intercecal, y anterior a la unión cecal. El delgado ducto eyaculador desemboca en el cirro, el cual es romo, no armado, ventro-lateral, ubicado en el lado derecho del cuerpo y sobresale superficialmente del cuerpo, presentando una apertura genital estrecha. El intestino es “dendrítico” con múltiples ramificaciones en su extensión, con el primer divertículo intestinal a corta distancia de la unión cecal, para luego continuar zigzagueando hasta el extremo posterior del cuerpo. El primer testículo aparece inmediatamente detrás del primer divertículo intestinal. Los testículos son elongados, lobulados y concentrándose en torno a la línea media longitudinal del cuerpo, extendiéndose hasta cerca del extremo posterior del cuerpo, siendo sobrepasados lateralmente por los divertículos del intestino. No se logró visualizar la vesícula excretora, mientras que la apertura de la misma era de forma ovalada.

Descripción *Hembra* (Figura 23, Tablas 6-7): Cuerpo elongado, aplanado dorsoventralmente, sin espinas en tegumento, aunque cubierto de finas estrías longitudinales y transversales, no hay presencia de ventosas. El cuerpo está claramente dividido en la distribución de sus órganos, un primer tercio donde se encuentran la mayoría de los órganos reproductivos y digestivos, y otros dos tercios donde están la vitelario e intestino. Apertura oral pequeña, ventral, subterminal. Esófago recto, aunque levemente curvado en su segmento medio, levemente anterior a la apertura del metratermo, paredes recubiertas externamente por glándulas esofágicas pequeñas, y otras de mayor tamaño alrededor de la apertura oral y en el área de la bifurcación cecal. Ciegos profundamente ramificados en toda su extensión y de mayor ancho en el área anterior. Estos se unen posteriormente para originar un ciego común o intestino. El útero, ovario, ootipo y receptáculo seminal son intercecales. El útero tiene forma de bobina, ubicado sobre la línea media longitudinal del cuerpo. Metratermo muy

desarrollado, curvado, ubicado en el lado derecho del cuerpo, el cual desemboca en un poro uterino, al lado derecho del esófago, a la altura de su último tercio, con una serie de estructuras glandulares en lado donde toma contacto cercano con el esófago. El ovario es tubular, delgado y sinuoso, mientras que el receptáculo seminal es pequeño y tiene forma de garrote, ubicado inmediatamente posterior al ovario, de ubicación central respecto a la línea media longitudinal del cuerpo. Ambos órganos ubicados en el último tercio del espacio intercecal. El ootipo está entre el útero y ovario hacia el lado derecho del cuerpo, recibiendo por un lado al ducto vitelino que pasa por el lado izquierdo del ovario, originándose desde el área de la vitelario, y por otro lado recibe el pasaje uterino desde el útero. Las glándulas vitelinas aparecen inmediatamente tras la unión de los ciegos y se extienden hasta el borde posterior del cuerpo. El intestino es “dendrítico”, presentando múltiples divertículos en toda su extensión, continuando a forma de zigzag hasta muy cerca del extremo posterior del cuerpo donde se observa distendido, ocupando gran parte del cuerpo, dejando algunos espacios para las glándulas vitelinas. El primer divertículo intestinal está a la altura de la unión cecal. La vesícula excretora es pequeña y tiene forma de “Y”. Los huevos son esféricos, de paredes delgadas y coloración amarillo pálido.

Hospedero tipo: *Cygnus melancoryphus* (Aves: Anatidae)

Sitio de infección: Cavidad celómica.

Localidad tipo: Cobquecura (región del Ñuble).

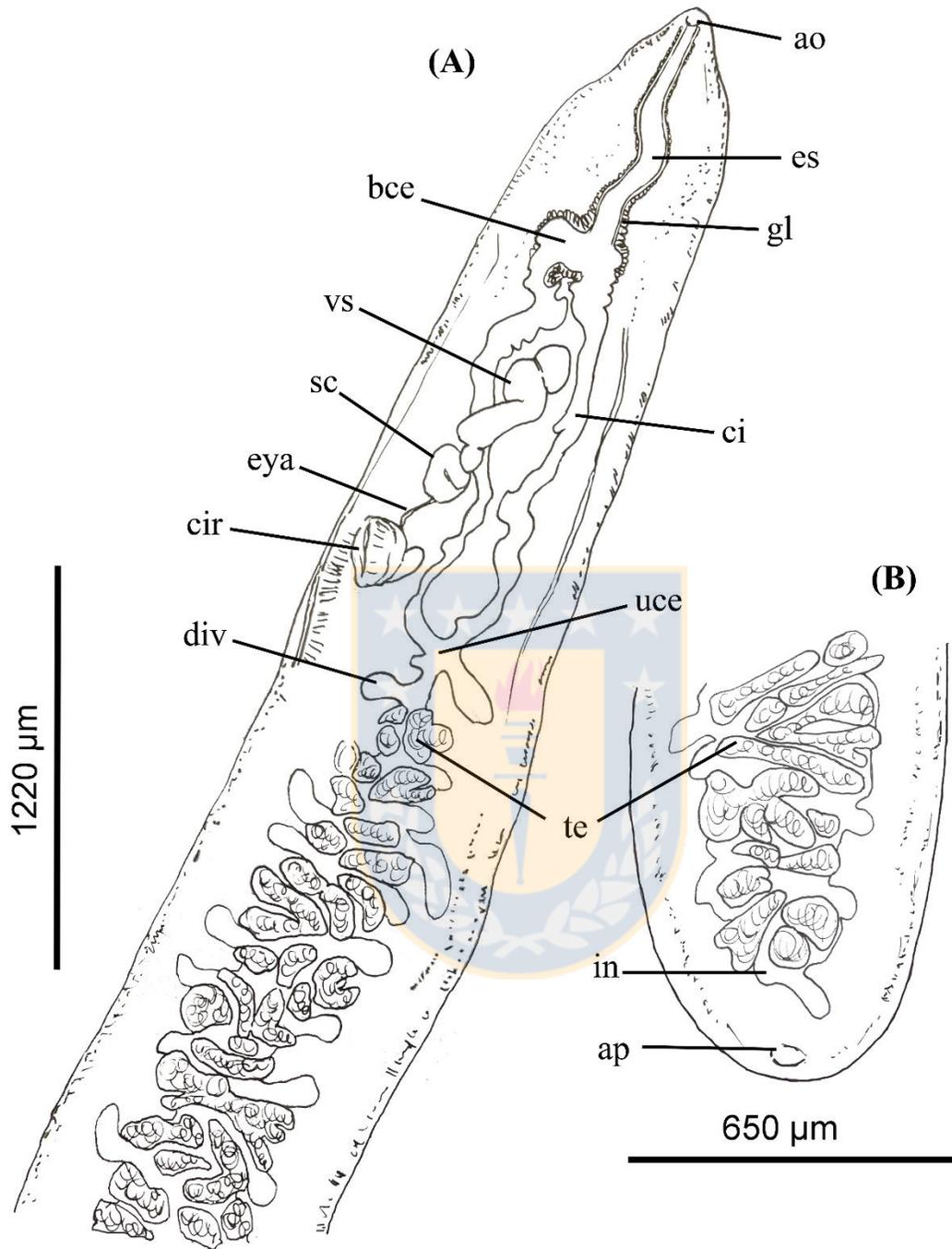


Figura 22. Macho de *Dendritobilharzia* sp. 4 aislada desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). (A) Tercio anterior del cuerpo, y parte del segundo tercio. (B) Extremo posterior del cuerpo con punta redondeada. Abreviaturas: ao= aperturas oral; ap= apertura vesícula excretora; bce= bifurcación cecal; ci= ciego intestinal; cir= cirro; div= divertículo intestinal; es= esófago; eya= ducto eyaculador; gl= glándulas esofágicas; in= intestino; pge= poro genital; sc= saco del cirro; te= testículo; uce= unión cecal; vs= vesícula seminal.

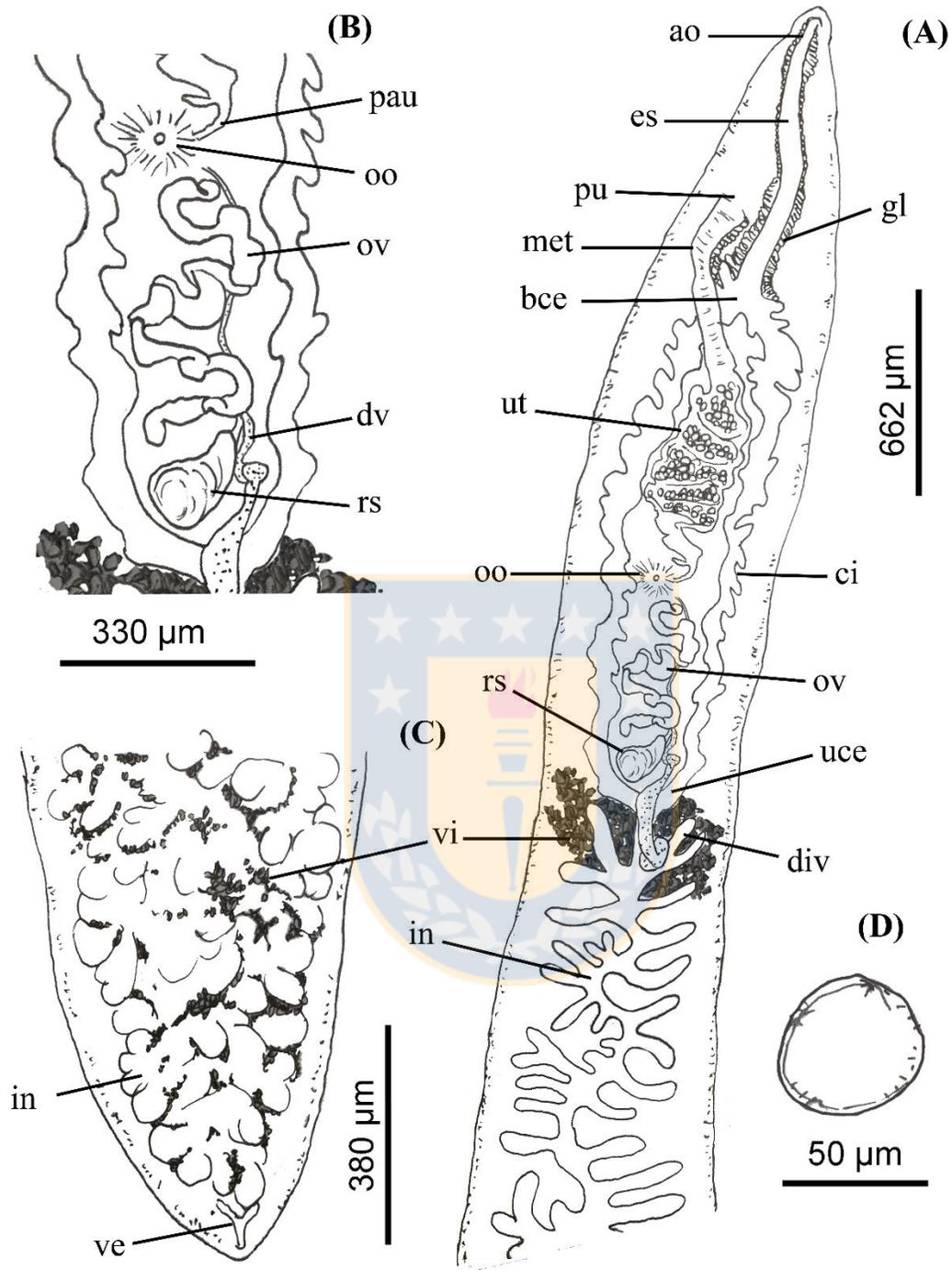


Figura 23. Hembra de *Dendritobilharzia* sp. 4 aislada desde el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). (A) Tercio anterior del cuerpo. (B) detalle del sistema reproductivo. (C) Extremo posterior con ciegos pletóricos de contenido. (D) Detalle de huevo observado en útero. Abreviaturas: ao= apertura oral; bce= bifurcación cecal; ci= ciego intestinal; div= divertículo intestinal; es= esófago; gl= glándulas esofágicas; in= intestino; met= metratermo; ov= ovario; pau= pasaje uterino; pu= poro uterino; rs= receptáculo seminal; uce= unión cecal; ut= útero; ve= vesícula excretora.

Tabla 7. Descriptores parasitológicos de cada uno de los taxones registrados en cada una de las especies de anátidos muestreados.

Hospedero	Taxón	Tipo*	I	I _M	A _M	R	P
<i>Anas flavirostris</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp. 1	Visceral	30	2,73	0,97	1-6	35,48
	<i>Trichobilharzia</i> sp. 2	Nasal	1	1,00	0,03	1	3,23
	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 2	Visceral	2	2,00	0,06	2	3,23
	Total						38,71
<i>Anas georgica</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp. 3	Visceral	91	5,69	3,25	1-42	57,14
	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 1	Visceral	2	1,00	0,07	1	7,14
	Total						64,29
<i>Mareca sibilatrix</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp. 4	Visceral	400	28,57	22,22	1-58	77,78
	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 3	Visceral	1	1,00	0,06	1	5,56
	Total						77,78
<i>Spatula cyanoptera</i>	<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	Visceral	413	68,83	68,83	1-66	100
	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 3	Visceral	3	3,00	0,50	3	16,67
	Total						100
<i>Cygnus melancoryphus</i>	<i>Nasusbilharzia melancorhypha</i>	Nasal	90	15	7,50	1-34	50
	<i>Dendritobilharzia</i> sp. 4	Visceral	3	3	0,25	3	8,33
	Schistosomatidae sp.	Visceral	80	16	6,67	1-33	41,67
	Total						66,67

Símbolo: *= tipo de esquistosoma aviar

4.3. Relaciones filogenéticas de los esquistosomas adultos aislados

Los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana de ambos genes soportaron el diagnóstico morfológico de los tres géneros aquí descritos, además de las especies *T. querquedulae* y *N. melancorhypha*. Por otro lado, permitió determinar la posición filogenética de otros dos taxones de los cuales solo se recuperaron estadios larvales y vermes fragmentados, y por lo cual no pudieron ser caracterizados morfológicamente. Todos los taxones aquí descritos pertenecen al clado DAS (antes BTGD) de los esquistosomas aviarios, con un soporte nodal robusto (95/1), mientras que todos los taxones del género *Trichobilharzia* aquí analizados forman parte del llamado Clado Q, igualmente con un soporte nodal robusto (99/1) (Brant y Loker 2009) (Figuras 24-26).

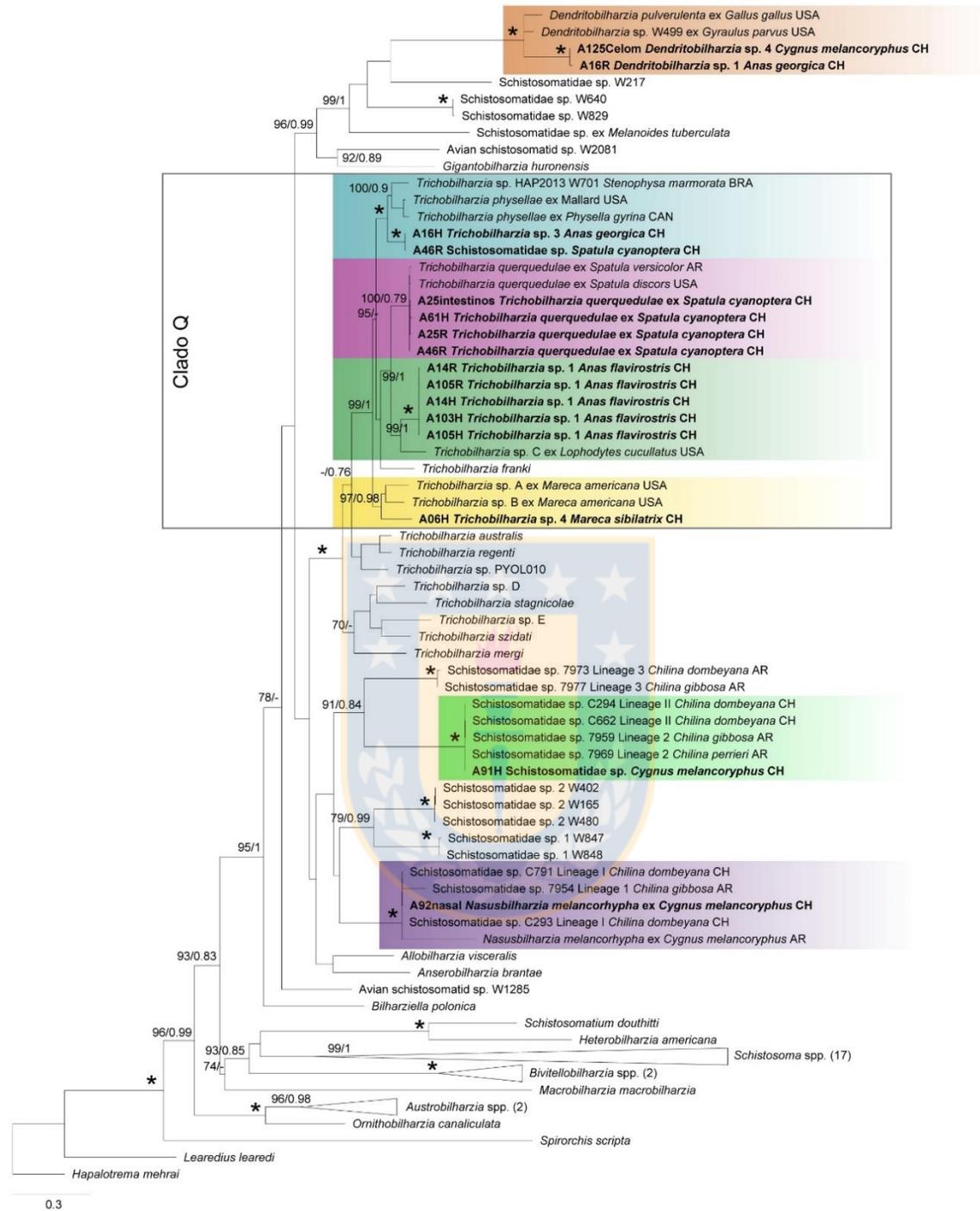


Figura 24. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen COI. Esta filogenia fue inferida de un alineamiento de 1.271 pb. Los modelos de sustitución calculados para MV e IB fueron TIM2+F+G4 (part1), GTR+F+I+G4 (part2), TIM+F+I+G4 (part3), y M_{138} , M_{201} , M_{162} , M_{189} , M_{134} , M_{203} (part1), M_{29} , M_{92} , M_{71} , M_{68} , M_{81} , M_{184} (part2), M_{200} , M_{203} , M_{201} , M_{166} , M_{191} (part3), respectivamente. Los mejores modelos se eligieron

usando el Criterio de Información Bayesiano (CIB). Los valores Bootstrap ≥ 70 (izquierda) and probabilidades posteriores ≥ 0.7 (derecha) se presentan en cada nodo. Un asterisco (*) indica soporte completo (100/1). Las secuencias generadas en el presente estudio se indican en negrita. Los grupos externos (“outgroups”) con más de dos secuencias se colapsaron con el número de secuencias detalladas entre paréntesis.

Cada uno de los taxones descritos fueron validados con elevados soportes nodales para MV e IB de cada gen. No obstante, la identidad de los taxones del género *Dendritobilharzia* aislados en el presente estudio no pudo ser determinada a nivel específico, ya que las relaciones filogenéticas variaron entre ambos genes; en el caso del gen COI, se generó un clado independiente, con un soporte nodal robusto (100/1), compuesto por las secuencias de *Dendritobilharzia* sp. aislados desde *A. georgica* y *C. melancoryphus*, el cual está cercanamente relacionado con *Dendritobilharzia pulverulenta*, lo cual sugeriría una especie distinta dentro del mismo género. Sin embargo, con base en el gen 28S sólo las secuencias de *A. georgica* formaron un clado independiente, con un soporte nodal robusto (100/1), cercanamente relacionado con *D. pulverulenta*, mientras que todas las demás secuencias se asociaron en un mismo clado junto al mencionado taxón, también con un soporte nodal robusto (100/1), indicando que corresponderían a dicha especie. En el caso del análisis concatenado, se obtuvo la misma topología señalada para el gen COI (Figuras 24, 26).

Para los taxones del género *Trichobilharzia* se obtuvieron las siguientes topologías en los análisis de MV e IB del gen COI: *Trichobilharzia* sp. 1 aislado desde *A. flavirostris* formó un clado independiente con un fuerte soporte nodal para ambos análisis, que está cercanamente relacionado, y con un fuerte soporte nodal, con *Trichobilharzia* sp. C de Estados Unidos; *Trichobilharzia* sp. 3 aislado desde *A. georgica* formó un clado independiente, aunque cercanamente relacionado con *T. physellae* de Norteamérica y otro *Trichobilharzia* no descrito de Brasil, ambos clados con un soporte nodal robusto (100/1). Los estadios inmaduros no identificados, aislados desde un ejemplar de *S. cyanoptera* formaron un clado común con *Trichobilharzia* sp. 3, con un soporte nodal robusto (100/1); *Trichobilharzia* sp. 4 aislado desde *M. sibilatrix* formó un clado independiente el cual se encuentra cercanamente relacionado, y con un soporte nodal robusto (97/0.98), con *Trichobilharzia* sp. A y *Trichobilharzia* sp. B de Norteamérica, y con una ubicación basal al resto de los taxones del clado Q; *T. querquedulae* aislado desde *S. cyanoptera* formó un clado

en común con *T. querquedulae* proveniente de Estados Unidos y Argentina con un soporte nodal robusto (100/0.79), indicando que son conspecíficos. El clado conteniendo a las diversas especies ya descritas de *Trichobilharzia*, junto con las mencionadas en el presente estudio presentaron un soporte nodal robusto (100/1) (Figura 24).

Por otro lado, en el árbol del gen 28S no se logró determinar una relación filogenética clara entre todos los taxones de *Trichobilharzia* analizados. No obstante, *Trichobilharzia* sp. 1 formó un clado con un soporte nodal robusto (98/0.87) con *T. physellae*, *Trichobilharzia* sp. 3 formó un clado común con un taxón de *Trichobilharzia* no identificado de Brasil, con un soporte nodal robusto (97/0.97), y *T. querquedulae* se agrupó con otras secuencias de la misma especie, aunque no definiéndose claramente como un clado del resto de *Trichobilharzia* y con un soporte nodal moderado (76/0.85). Adicionalmente, las secuencias de *Trichobilharzia* sp. 4 quedaron separadas entre sí, a pesar de corresponder al mismo taxón. Pese a lo anterior, tanto el clado DAS como el Q presentaron soportes nodales robustos (100/1) (Figura 25). Para el concatenado de los genes 28S-COI se obtuvo una topología similar a COI, aunque con algunas diferencias: *Trichobilharzia* sp. 1 formó un clado independiente con soporte nodal robusto (100/1) y cercanamente relacionado con *T. querquedulae*; *Trichobilharzia* sp. 3 quedó como un taxón cercanamente relacionado a *T. physellae* y un *Trichobilharzia* no identificado de Brasil, con un soporte nodal robusto (100/1); *Trichobilharzia* sp. 4 aparece como un taxón cercanamente relacionado a *Trichobilharzia* sp. A, aunque con un soporte nodal moderado para MV (87) y no significativo para IB (Figura 26). Las posiciones filogenéticas de *Trichobilharzia* sp. 1, *Trichobilharzia* sp. 3 y *Trichobilharzia* sp. 4, al menos para el gen COI y el concatenado de 28S-COI, indicarían que estos corresponderían a taxones nuevos o al menos aún no caracterizados a nivel molecular.

La secuencia de *N. melancorhypha* generada en el presente estudio formó un clado monofilético en la filogenia del gen COI, con un soporte nodal robusto (100/1), con el mismo taxón caracterizado en Argentina (Flores *et al.* 2021), además de las secuencias de furcocercarias linaje 1 de Argentina (Flores *et al.* 2015) y Linaje I de Chile (ver capítulo I). Esta especie se relaciona cercanamente con otros taxones no identificados, aislados desde caracoles planórbidos, aunque con un soporte nodal bajo. Una topología similar se determinó para el gen 28S y el concatenado de ambos genes, en ambos casos con un soporte nodal

robusto (100/1). Para 28S y el concatenado 28S-COI, este clado se presentó basal al resto del clado DAS, con excepción de *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895) Looss, 1899 y con un soporte nodal robusto (100/1) (Figuras 24-26).

Un taxón no identificado, indicado como A91H Schistosomatidae sp., aislado desde *C. melancoryphus* formó un clado monofilético en la filogenia del gen COI, y con un soporte nodal robusto (100/1), junto a secuencias de unos esquistosomas aviares no identificados provenientes de caracoles *Chilina* de Argentina (linaje 2) (Flores *et al.* 2015) y Chile (Linaje II) (ver capítulo I). Este clado está cercanamente relacionado al linaje 3 de un esquistosoma no descrito proveniente de Argentina (Flores *et al.* 2015), con un soporte nodal moderado para MV (91) y fuerte para IB (0.84). Para el caso del gen 28S y el concatenado de 28S-COI, este clado se relacionó cercanamente, y con un soporte nodal robusto (98/1 para 28S y 95/1 para concatenado 28S-COI), con un esquistosoma no identificado de Argentina transmitido por *Chilina*, linaje 3, además de varios taxones no identificados, transmitidos por otras familias de caracoles, *Gigantobilharzia huronensis* Najim, 1950 y *Dendritobilharzia* spp. (Figuras 24-26).

Las distancias genéticas para cada gen entre las secuencias generadas en el presente estudio y las de otros taxones cercanamente relacionados, según lo mencionado en los análisis filogenéticos, se pueden observar en la Tabla 8 para el gen 28S y Tabla 9 para el gen COI.

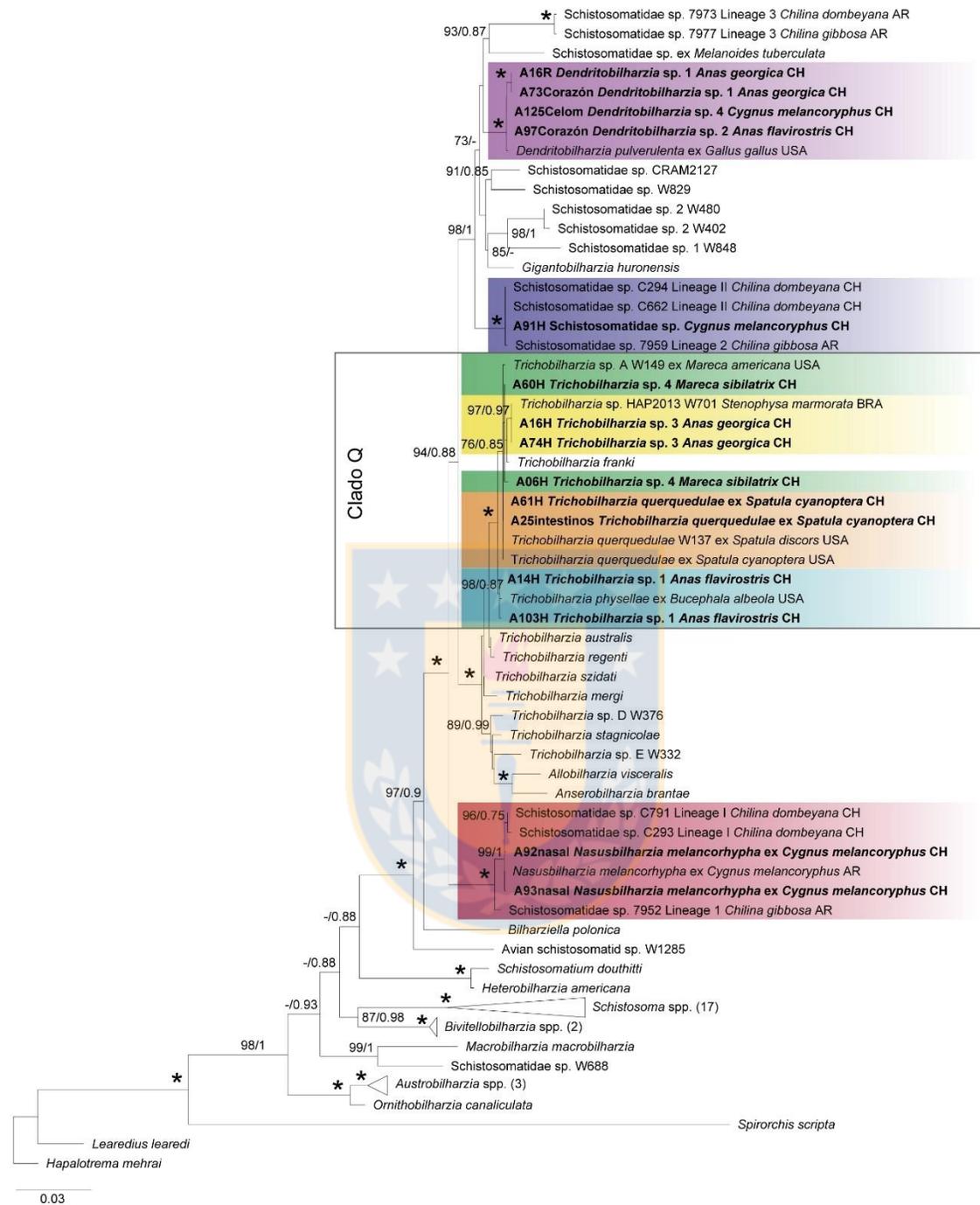


Figura 25. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para el gen 28S. Esta filogenia fue inferida de un alineamiento de 1.708 pb. Los modelos de sustitución calculados para MV e IB fueron GTR+F+G4 y M_{198} , M_{177} , M_{203} , M_{195} , M_{200} , M_{179} , respectivamente. Los mejores modelos se eligieron usando el Criterio de Información Bayesiano (CIB). Los valores Bootstrap ≥ 70 (izquierda) and probabilidades posteriores ≥ 0.7 (derecha) se presentan en cada nodo. Un asterisco (*) indica soporte completo (100/1). Las

secuencias generadas en el presente estudio se indican en negrita. Los grupos externos (“outgroups”) con más de dos secuencias se colapsaron con el número de secuencias detalladas entre paréntesis.

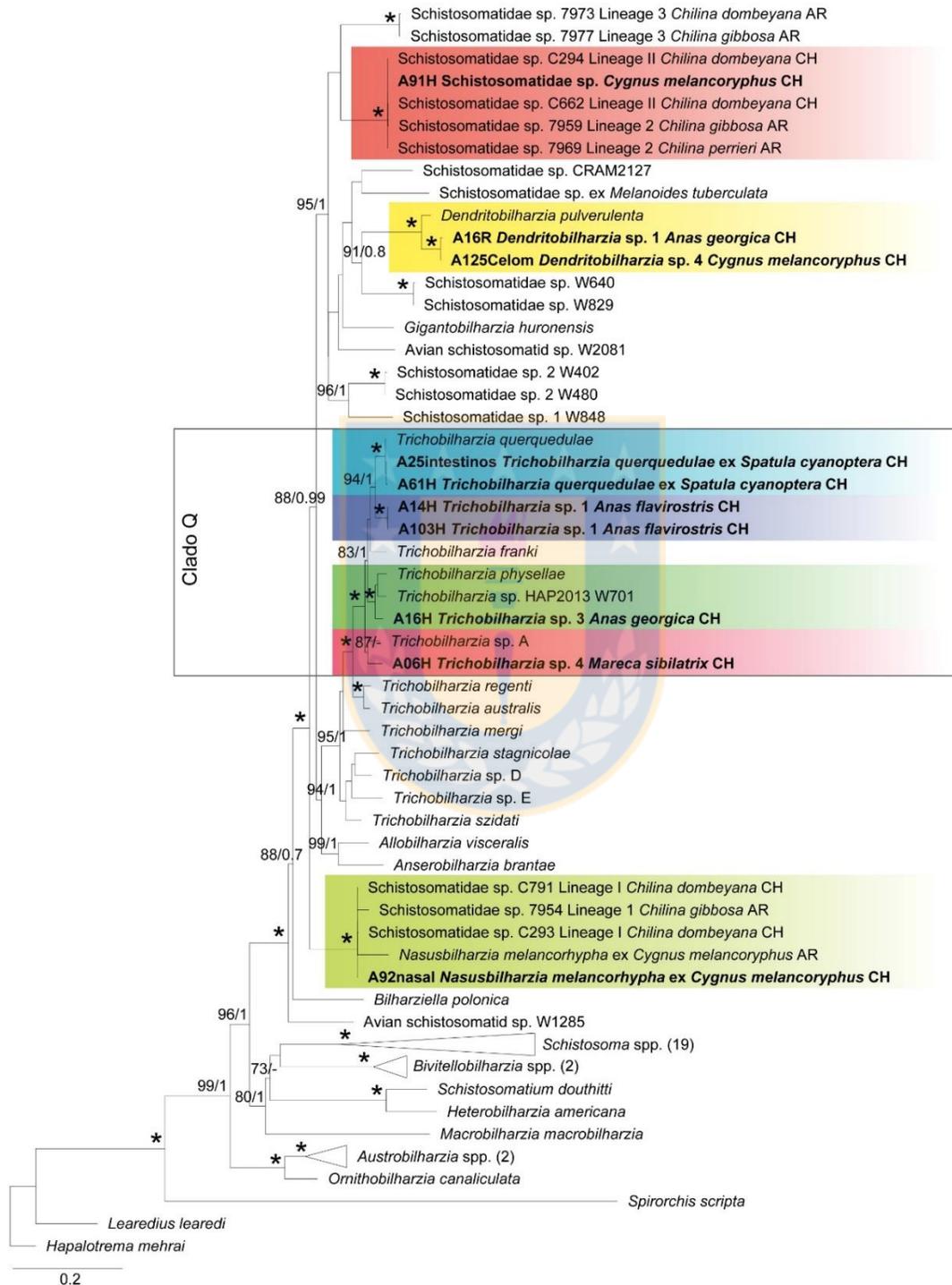


Figura 26. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) para un subconjunto de datos de secuencias de esquistosomas para los genes 28S-COI concatenados. Esta filogenia fue inferida de un

alineamiento de 2920 pb. Los modelos de sustitución calculados para MV e IB fueron GTR+F+I+G4 (nonCoding), TIM2+F+I+G4 (part1), GTR+F+I+G4 (part2), TIM+F+I+G4 (part3), y M_{177} , M_{203} , M_{195} (nonCoding), M_{138} , M_{189} , M_{162} , M_{193} , M_{201} , M_{203} , M_{134} , M_{200} (part1), M_{29} , M_{68} , M_{160} , M_{54} , M_{145} , M_{81} , M_{92} , M_{129} (part2), M_{200} , M_{166} , M_{203} , M_{191} (part3), respectivamente. Los mejores modelos se eligieron usando el Criterio de Información Bayesiano (CIB). Los valores Bootstrap ≥ 70 (izquierda) y probabilidades posteriores ≥ 0.7 (derecha) se presentan en cada nodo. Un asterisco (*) indica soporte completo (100/1). Las secuencias generadas en el presente estudio se indican en negrita. Los grupos externos (“outgroups”) con más de dos secuencias se colapsaron con el número de secuencias detalladas entre paréntesis.



Tabla 8. Distancias genéticas para le gen 28S entre los taxones aquí descritos y otros relacionados filogenéticamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31					
1 A91H Schistosomatidae sp.																																				
2 A06H <i>Trichobilharzia</i> sp. 4	0,022																																			
3 A60H <i>Trichobilharzia</i> sp. 4	0,022	0,000																																		
4 A16H <i>Trichobilharzia</i> sp. 3	0,022	0,002	0,002																																	
5 A74H <i>Trichobilharzia</i> sp. 3	0,022	0,002	0,002	0,000																																
6 A61H <i>T. querquedulae</i>	0,023	0,001	0,001	0,003	0,003																															
7 A25intestinos <i>T. querquedulae</i>	0,023	0,001	0,001	0,003	0,003	0,000																														
8 A14H <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,023	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002																													
9 A103H <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,024	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001																												
10 A92nasal <i>N. melancorhypha</i>	0,036	0,033	0,033	0,033	0,033	0,034	0,034	0,034	0,033																											
11 A93nasal <i>N. melancorhypha</i>	0,035	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033	0,032	0,001																										
12 A16R <i>Dendritobilharzia</i> sp. 1	0,022	0,025	0,025	0,027	0,027	0,026	0,026	0,027	0,027	0,035	0,035																									
13 A73Corazón <i>Dendritobilharzia</i> sp. 1	0,022	0,025	0,025	0,027	0,027	0,026	0,026	0,027	0,027	0,035	0,035	0,000																								
14 A97Corazón <i>Dendritobilharzia</i> sp. 2	0,022	0,025	0,025	0,027	0,027	0,026	0,026	0,027	0,027	0,035	0,035	0,000	0,000																							
15 A125Celom <i>Dendritobilharzia</i> sp. 4	0,022	0,025	0,025	0,027	0,027	0,026	0,026	0,027	0,027	0,035	0,035	0,000	0,000	0,000																						
16 <i>Trichobilharzia franki</i>	0,023	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,005	0,034	0,033	0,026	0,026	0,026	0,026																					
17 <i>Trichobilharzia physellae</i>	0,024	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,035	0,034	0,028	0,028	0,028	0,028	0,005																				
18 <i>Trichobilharzia querquedulae</i>	0,023	0,001	0,001	0,003	0,003	0,000	0,000	0,002	0,002	0,034	0,033	0,026	0,026	0,026	0,026	0,002																				
19 <i>Trichobilharzia</i> sp. HAP2013	0,022	0,002	0,002	0,000	0,000	0,003	0,003	0,002	0,002	0,033	0,032	0,027	0,027	0,027	0,027	0,002	0,002																			
20 <i>Trichobilharzia</i> sp. A	0,024	0,002	0,002	0,004	0,004	0,001	0,001	0,002	0,003	0,035	0,034	0,027	0,027	0,027	0,027	0,003	0,003	0,001	0,004																	
21 Schistosomatidae sp. C791 Lineage_I	0,035	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033	0,032	0,001	0,000	0,035	0,035	0,035	0,035	0,033	0,034	0,033	0,032	0,034																
22 Schistosomatidae sp. C662 Lineage_II	0,000	0,022	0,022	0,022	0,022	0,023	0,023	0,023	0,024	0,036	0,035	0,022	0,022	0,022	0,023	0,024	0,023	0,022	0,024	0,035																
23 <i>Nasusbilharzia melancorhypha</i>	0,035	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033	0,032	0,001	0,000	0,035	0,035	0,035	0,035	0,033	0,034	0,033	0,032	0,034	0,000	0,035														
24 Schistosomatidae sp. 7952 Lineage_1	0,035	0,031	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,006	0,006	0,034	0,034	0,034	0,034	0,032	0,033	0,032	0,031	0,033	0,006	0,035	0,006													
25 Schistosomatidae sp. 7959 Lineage_2	0,001	0,023	0,023	0,023	0,023	0,024	0,024	0,024	0,025	0,037	0,036	0,022	0,022	0,022	0,024	0,025	0,024	0,023	0,025	0,036	0,001	0,036	0,035													
26 Schistosomatidae sp. 7973 Lineage_3	0,035	0,039	0,039	0,041	0,041	0,040	0,040	0,042	0,043	0,050	0,049	0,035	0,035	0,035	0,035	0,040	0,043	0,040	0,041	0,041	0,049	0,035	0,049	0,045	0,035											
27 <i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	0,022	0,026	0,026	0,027	0,027	0,027	0,027	0,028	0,027	0,036	0,035	0,001	0,001	0,001	0,001	0,027	0,029	0,027	0,027	0,027	0,035	0,022	0,035	0,035	0,023	0,036										
28 <i>Allobilharzia visceralis</i>	0,031	0,027	0,027	0,027	0,027	0,028	0,028	0,028	0,029	0,037	0,036	0,033	0,033	0,033	0,033	0,027	0,029	0,028	0,027	0,029	0,036	0,031	0,036	0,037	0,031	0,039	0,034									
29 <i>Bilharziella polonica</i>	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045	0,046	0,043	0,043	0,047	0,047	0,047	0,047	0,045	0,046	0,045	0,044	0,046	0,043	0,044	0,043	0,040	0,045	0,060	0,046	0,044								
30 <i>Anserobilharzia brantae</i>	0,035	0,031	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,033	0,046	0,045	0,035	0,035	0,035	0,035	0,032	0,033	0,032	0,031	0,033	0,045	0,035	0,045	0,044	0,035	0,042	0,036	0,023	0,051							
31 <i>Gigantobilharzia huronensis</i>	0,022	0,027	0,027	0,027	0,027	0,028	0,028	0,028	0,027	0,036	0,035	0,022	0,022	0,022	0,022	0,028	0,029	0,028	0,027	0,029	0,035	0,022	0,035	0,035	0,022	0,035	0,021	0,035	0,045	0,041						

Tabla 9. Distancias genéticas para le gen COI entre los taxones aquí descritos y otros relacionados filogenéticamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
1 A16H <i>Trichobilharzia</i> sp. 3																																					
2 A46R <i>Trichobilharzia</i> sp. 3	0,080																																				
3 A25intestinos <i>T. querquedulae</i>	0,084	0,004																																			
4 A61H <i>T. querquedulae</i>	0,086	0,010	0,010																																		
5 A25R <i>T. querquedulae</i>	0,080	0,004	0,004	0,010																																	
6 A46R <i>T. querquedulae</i>	0,002	0,082	0,086	0,088	0,082																																
7 A14R <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,092	0,082	0,084	0,086	0,080	0,094																															
8 A14H <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,095	0,086	0,088	0,086	0,086	0,097	0,000																														
9 A105R <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,090	0,084	0,086	0,088	0,082	0,092	0,002	0,002																													
10 A105H <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,090	0,084	0,086	0,088	0,082	0,092	0,002	0,002	0,004																												
11 A103H <i>Trichobilharzia</i> sp. 1	0,092	0,082	0,084	0,086	0,080	0,094	0,000	0,000	0,002	0,002																											
12 A06H <i>Trichobilharzia</i> sp. 4	0,094	0,096	0,100	0,106	0,096	0,096	0,106	0,104	0,108	0,108	0,106																										
13 A91H Schistosomatidae sp.	0,178	0,167	0,171	0,178	0,167	0,180	0,184	0,195	0,182	0,186	0,184	0,186																									
14 A92nasal <i>N. melancorhypha</i>	0,169	0,167	0,169	0,171	0,165	0,171	0,153	0,155	0,151	0,155	0,153	0,171	0,192																								
15 A125Cebm <i>Dendritobilharzia</i> sp. 4	0,222	0,204	0,206	0,208	0,204	0,224	0,200	0,197	0,202	0,202	0,200	0,204	0,243	0,220																							
16 A16R <i>Dendritobilharzia</i> sp. 1	0,224	0,206	0,208	0,210	0,206	0,227	0,202	0,197	0,204	0,204	0,202	0,206	0,243	0,222	0,008																						
17 <i>Trichobilharzia franki</i>	0,088	0,076	0,080	0,086	0,080	0,090	0,086	0,086	0,084	0,088	0,086	0,092	0,174	0,162	0,213	0,215																					
18 <i>Trichobilharzia physellae</i>	0,061	0,086	0,090	0,092	0,086	0,063	0,098	0,102	0,096	0,100	0,098	0,098	0,194	0,176	0,222	0,224	0,094																				
19 <i>Trichobilharzia querquedulae</i>	0,076	0,006	0,010	0,016	0,006	0,078	0,080	0,084	0,082	0,082	0,080	0,094	0,168	0,166	0,204	0,207	0,078	0,084																			
20 <i>Trichobilharzia</i> sp. HAP2013	0,071	0,100	0,100	0,100	0,096	0,073	0,088	0,088	0,086	0,090	0,088	0,108	0,182	0,171	0,202	0,204	0,106	0,076	0,098																		
21 <i>Trichobilharzia</i> sp. A	0,090	0,092	0,096	0,096	0,092	0,092	0,112	0,118	0,110	0,114	0,112	0,090	0,176	0,153	0,204	0,206	0,098	0,106	0,092	0,092																	
22 <i>Trichobilharzia</i> sp. B	0,090	0,080	0,084	0,090	0,080	0,092	0,106	0,111	0,108	0,108	0,106	0,071	0,178	0,163	0,210	0,212	0,088	0,092	0,078	0,086	0,073																
23 <i>Trichobilharzia</i> sp. C	0,082	0,080	0,084	0,086	0,080	0,084	0,076	0,079	0,078	0,078	0,076	0,090	0,188	0,157	0,210	0,212	0,086	0,096	0,080	0,106	0,090	0,082															
24 Schistosomatidae sp. C293 Lineage I	0,176	0,174	0,176	0,176	0,171	0,178	0,158	0,162	0,156	0,160	0,158	0,176	0,196	0,004	0,227	0,229	0,174	0,180	0,172	0,180	0,160	0,167	0,167														
25 Schistosomatidae sp. C294 Lineage II	0,178	0,167	0,171	0,178	0,167	0,180	0,184	0,195	0,182	0,186	0,184	0,186	0,000	0,192	0,243	0,243	0,174	0,194	0,168	0,182	0,176	0,178	0,188	0,196													
26 <i>Nasubilharzia melancorhypha</i>	0,184	0,176	0,176	0,178	0,176	0,186	0,186	0,179	0,184	0,188	0,186	0,194	0,196	0,133	0,241	0,245	0,178	0,192	0,178	0,178	0,188	0,178	0,184	0,143	0,196												
27 Schistosomatidae sp. 7954 lineage 1	0,176	0,168	0,170	0,172	0,166	0,178	0,162	0,166	0,160	0,164	0,162	0,174	0,166	0,059	0,221	0,223	0,160	0,186	0,164	0,176	0,152	0,164	0,164	0,065	0,166	0,154											
28 Schistosomatidae sp. 7969 lineage 2	0,178	0,167	0,171	0,178	0,167	0,180	0,184	0,195	0,182	0,186	0,184	0,186	0,000	0,192	0,243	0,243	0,174	0,194	0,168	0,182	0,176	0,178	0,188	0,196	0,000	0,196	0,166										
29 Schistosomatidae sp. 7973 lineage 3	0,155	0,147	0,151	0,153	0,147	0,157	0,163	0,169	0,161	0,165	0,163	0,155	0,149	0,139	0,212	0,212	0,145	0,171	0,147	0,157	0,133	0,157	0,143	0,151	0,149	0,184	0,145	0,149									
30 <i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	0,204	0,188	0,190	0,196	0,188	0,206	0,194	0,200	0,192	0,196	0,194	0,196	0,229	0,194	0,114	0,120	0,198	0,196	0,188	0,210	0,200	0,192	0,196	0,198	0,229	0,220	0,201	0,229	0,200								
31 <i>Dendritobilharzia</i> sp. W499	0,210	0,190	0,190	0,192	0,188	0,212	0,178	0,179	0,176	0,180	0,178	0,196	0,222	0,210	0,110	0,116	0,196	0,202	0,190	0,204	0,204	0,206	0,192	0,216	0,222	0,235	0,213	0,222	0,204	0,071							
32 <i>Allobilharzia visceralis</i>	0,153	0,153	0,157	0,163	0,153	0,155	0,151	0,160	0,149	0,153	0,151	0,149	0,157	0,159	0,212	0,214	0,149	0,155	0,153	0,141	0,133	0,129	0,149	0,167	0,157	0,212	0,160	0,157	0,149	0,192	0,202						
33 <i>Bilharziella polonica</i>	0,190	0,169	0,171	0,178	0,167	0,190	0,190	0,200	0,188	0,192	0,190	0,182	0,200	0,167	0,214	0,214	0,174	0,190	0,170	0,192	0,167	0,178	0,165	0,178	0,200	0,196	0,168	0,200	0,192	0,202	0,210	0,176					
34 <i>Anserobilharzia brantae</i>	0,127	0,141	0,145	0,147	0,141	0,124	0,137	0,146	0,135	0,139	0,137	0,135	0,196	0,155	0,214	0,218	0,141	0,139	0,137	0,145	0,137	0,155	0,131	0,167	0,196	0,200	0,162	0,196	0,151	0,186	0,192	0,141	0,169				
35 <i>Gigantobilharzia huronensis</i>	0,171	0,180	0,180	0,186	0,176	0,169	0,192	0,197	0,190	0,194	0,192	0,169	0,184	0,184	0,233	0,235	0,180	0,184	0,180	0,171	0,163	0,165	0,182	0,192	0,184	0,196	0,191	0,184	0,178	0,220	0,229	0,180	0,210	0,188			

4.4. Relaciones entre variables de las aves y los esquistosomas

Se observó una asociación significativa entre la variable especie de ave y presencia de parásitos, observándose significativamente menor disparidad ('odds') en *A. flavirostris* que en *M. sibilatrix* (Tabla 10), mientras que las variables especie de ave y localidad se asociaron significativamente con la abundancia, presentando la especie *M. sibilatrix*, y la localidad Reloca mayores abundancias que el grueso de las otras categorías de cada variable (Tabla 11).

Por otro lado, las variables de edad y sexo de cada especie aviar no resultaron significativas en los análisis realizados.

Tabla 10. Análisis de Regresión logística simple considerando como variables la especie de los anátidos muestreados y la presencia de esquistosomas adultos.

		Número de obs	= 89				
		LR chi2(3)*	= 8,62				
		Prob > chi2	= 0,0349				
Logaritmo de verosimilitud = -56,112448							

Presencia	Odds ratio	Error estándar	z	P> z	[Intervalo de confianza 95%]		

<i>M. sibilatrix</i>							
<i>A. flavirostris</i>	0,1804511	0,1220407	-2,53	0,011	0,0479385	0,6792578	
<i>A. georgica</i>	0,5142857	0,3551865	-0,96	0,336	0,1328404	1,991034	
<i>C. melancoryphus</i>	0,5714286	0,4768703	-0,67	0,502	0,1113306	2,932981	
<i>S. cyanoptera</i>	1 (vacío)						
_cons	3,5	1,984313	2,21	0,027	1,152079	10,63295	

*LR= prueba de razón de verosimilitud

Tabla 11. Análisis estadístico de Regresión binomial negativa considerando como variables especie de los anátidos muestreados, localidad de colecta y la abundancia de los esquistosomas adultos.

		Número de obs				
Dispersión: media		= 95	LR chi2(14)		= 69,33	
Logaritmo de verosimilitud = -238,39053			Prob > chi2		= 0,0000	
Abundancia	Coefficiente	Error estándar	z	P> z	[Intervalo de confianza 95%]	
<i>M. sibilatrix</i>						
<i>A. flavirostris</i>	-3,679453	0,6549596	-5,62	0,000	-4,96315	-2,395756
<i>A. georgica</i>	-1,955197	0,4315677	-4,53	0,000	-2,801054	-1,10934
<i>C. melancoryphus</i>	-0,6759676	0,947644	-0,71	0,476	-2,533316	1,18138
<i>S. cyanoptera</i>	1,084858	0,6386548	1,70	0,089	-0,1668823	2,336598
Reloca						
Chillán	-0,8582903	1,529335	-0,56	0,575	-3,855733	2,139152
Cobquecura	-2,261752	1,56508	-1,45	0,148	-5,329252	0,8057475
El Quillai	-0,8676994	0,9103308	-0,95	0,341	-2,651915	0,9165162
Nebuco	-0,8846741	0,6534741	-1,35	0,176	-2,16546	0,3961115
Niniquihue	-20,60761	5561,522	-0,00	0,997	-10920,99	10879,78
Portezuelo	-2,937731	1,621894	-1,81	0,070	-6,116585	0,2411232
Quillón	-20,60761	5561,522	-0,00	0,997	-10920,99	10879,78
San Fabián	-0,1022698	1,467855	-0,07	0,944	-2,979212	2,774673
Ñuble	-20,60761	3932,59	-0,01	0,996	-7728,343	7687,127
Santa Clara	-3,360361	1,765261	1,90	0,057	-6,820209	0,0994878
SN Carlos Anwandter	0 (omitido)					
_cons	4,036327	0,7345442	5,50	0,000	2,596646	5,476007

prueba de razón de verosimilitud (LR) de alfa=0: chibar2(01) = 860,53 Prob >= chibar2 = 0,000

4.5. Especificidad de esquistosomas adultos

Respecto a la especificidad de los esquistosomas adultos aislados en el presente estudio, se determinó que los taxones *Trichobilharzia* sp. 1, *Trichobilharzia* sp. 2, *Trichobilharzia* sp. 4, *T. querquedulae*, *N. melancorhypha*, *Dendritobilharzia* sp. 1, *Dendritobilharzia* sp. 2 y *Dendritobilharzia* sp. 4 presentarían cada uno el valor 1 para el índice S_{TD} , considerando que cada uno de estos taxones fue aislado solo en una especie aviar, indicando una alta especificidad. Por otro lado, los taxones *Trichobilharzia* sp. 3 y *Dendritobilharzia* sp. 3

presentaron un valor de 1,67 para el índice S_{TD} , cada uno, indicando un menor nivel de especificidad, teniendo en consideración que cada trematodo parasitó anátidos de géneros distintos; *Trichobilharzia* sp. 3 aislado desde *A. georgica* y *S. cyanoptera*, y *Dendritobilharzia* sp. 3 aislado desde *M. sibilatrix* y *S. cyanoptera*.



5. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten aceptar la hipótesis de un taxón distinto en el cisne de cuello negro respecto a los taxa aislados en los patos. Este estudio corresponde a la primera caracterización morfológica y molecular de esquistosomas aviáres adultos en Chile, y uno de los pocos realizados en el Neotrópico. Se registró un total de cinco taxones para el género *Trichobilharzia*, uno para *Nasubilharzia*, cuatro para *Dendritobilharzia* y otro taxón que sólo fue caracterizado a nivel molecular, Schistosomatidae sp. Las cinco especies de anátidos considerados dentro del estudio resultaron parasitados con al menos un taxón de esquistosoma aviar, con una prevalencia total de 61,05%, lo cual es similar a lo planteado en estudios previos (Brant y Loker 2009; Jouet *et al.* 2009; Oyarzún-Ruiz *et al.* 2019; Davis *et al.* 2022). Dentro de estos se describieron dos esquistosomas nasales, *Trichobilharzia* sp. 2 y *N. melancorhypha*, con los esquistosomas restantes categorizados como viscerales, además de ampliar la distribución geográfica conocida de *T. querquedulae* y *N. melancorhypha* a Chile. En el caso de los anátidos *A. flavirostris*, *M. sibilatrix* y *S. cyanoptera* se registraron por primera vez como hospederos definitivos de esquistosomas aviáres en el Neotrópico (ver Flores *et al.* 2015, 2021; Ebbs *et al.* 2016).

En el caso de los patos, se describieron cinco taxones del género *Trichobilharzia*, los cuales con excepción de *T. querquedulae*, no se corresponden con especies previamente descritas en la literatura, y aún más interesante, ninguno de estos compartidos entre las especies de patos analizados en el presente estudio, con excepción de *Trichobilharzia* sp. 3 que se aisló desde *A. georgica* y *S. cyanoptera*. Sin embargo, se plantea que este taxón parasitó de forma accidental a *S. cyanoptera*, ya que su secuencia se obtuvo desde vermes definidos como estadios inmaduros, los cuales carecían de rasgos típicos para su identificación, por lo cual se optó por un enfoque molecular. Estos vermes se aislaron solo desde un ave. Además, todos los estadios adultos de *S. cyanoptera* correspondieron morfológica- como molecularmente con *T. querquedulae*.

Szidat (1951) menciona a la especie *T. physellae* desde *A. georgica* en Argentina, sin embargo, no entregó detalles sobre la descripción de estos vermes. Acorde a los análisis filogenéticos del gen COI en el presente estudio, *Trichobilharzia* sp. 3 que fue aislado desde *A. georgica* correspondería a un taxón hermana de *T. physellae*, tratándose de una especie

distinta. Esto fue corroborado también a través de la caracterización morfológica de los vermes; en el caso de los machos, la ubicación de la reunión cecal está entre el acetábulo y vesícula seminal en *T. physellae* (McMullen y Beaver 1945), mientras que *Trichobilharzia* sp. 3 está ubicada posteriormente, entre la vesícula seminal y el canal ginecóforo, además de que el número de testículos es menor en el presente taxón que en *T. physellae*. Además, la distancia entre el acetábulo y canal ginecóforo, como la longitud del mismo canal, son mayores en el mencionado taxón en comparación con *T. physellae*. Respecto a las hembras, en *Trichobilharzia* sp. 3 la longitud del ovario es mayor, mientras que las dimensiones de los huevos son menores en comparación con lo indicado para *T. physellae* (ver Tabla 4). Para aclarar esta situación se requeriría una revisión del material de Szidat (1951), de haberse depositado en alguna colección, o coleccionar dicha especie de pato desde la localidad mencionada por el autor.

En el caso del gen 28S, *Trichobilharzia* sp. 3 quedó relacionado cercanamente con un taxón no identificado de *Trichobilharzia* de Brasil, mientras que otro esquistosoma aislado en este estudio, *Trichobilharzia* sp. 1 desde *A. flavirostris*, quedó cercanamente relacionado con *T. physellae*. Estos dos últimos taxones se asemejan morfológicamente en presentar la reunión cecal a la altura de acetábulo-vesícula seminal, sin embargo, se diferencian en otros detalles como la presencia de espinas largas en el borde anterior de la ventosa oral, lo cual no es mencionado en *T. physellae*, mayor distancia entre acetábulo y canal ginecóforo, mayor longitud del canal ginecóforo, y testículos más pequeños en *Trichobilharzia* sp.1 respecto a *T. physellae*. En la filogenia de COI, *Trichobilharzia* sp. 1 quedó cercanamente relacionado con una especie caracterizada sólo a nivel molecular, *Trichobilharzia* sp. C desde el anátido *Lophodytes cucullatus* (Linnaeus, 1758) (Brant y Loker 2009). Las diferencias entre *Trichobilharzia* sp. 1 y *Trichobilharzia* sp. 3 son sutiles, entre las cuales están la diferencia en la posición de la reunión cecal y papila genital, mayores dimensiones de la ventosa oral y acetábulo, mayor longitud de canal ginecóforo y mayor número de testículos en *Trichobilharzia* sp. 1, además de una mayor longitud de la vesícula seminal y mayor distancia entre acetábulo y canal ginecóforo en *Trichobilharzia* sp. 3 (ver Tabla 4).

Los patos hospederos de *T. physellae* son considerados un clado ecológico, y no uno filogenético, llamado “patos buceadores”, incluyendo a los géneros *Bucephala* Baird, 1858, *Aythya* Boie, 1822, *Mergus* Linnaeus, 1758 y *Clangula* Leach, 1819 como hospederos (Brant

y Loker 2009; Pinto *et al.* 2014), dentro de los cuales *A. georgica* y *A. flavirostris* no forman parte (Johnsgard 2010). A pesar de que *T. physellae* no se ha reportado en el Neotrópico, e ignorando la sola mención de Szidat (1951), su presencia no puede descartarse en Chile, Sudamérica inclusive, considerando que los géneros *Merganetta* Gould, 1842 y *Oxyura* Bonaparte, 1828 al ser patos buceadores (Martínez y González 2017) podrían formar parte de este clado ecológico de patos mencionado por Brant y Loker (2009), resultando ser potenciales candidatos para dicha especie de esquistosoma aviar.

Desde el punto de vista filogenético, la especie visceral *Trichobilharzia* sp. 4 aislada desde *M. sibilatrix* también forma parte del clado Q, junto a los otros taxones aquí descritos. En la filogenia del gen COI, éste quedó cercanamente relacionado con otros dos taxones caracterizados solo a nivel molecular; *Trichobilharzia* sp. A y *Trichobilharzia* sp. B, ambos aislados desde *Mareca americana* en Estados Unidos (Brant y Loker 2009). Mientras tanto, en la filogenia del gen 28S las relaciones filogenéticas no fueron evidentes dentro del clado Q, sin embargo, en el concatenado de 28S-COI sí se formaron claramente los clados, y la secuencia de *Trichobilharzia* sp. 4 formó un clado en común con *Trichobilharzia* sp. A. Estas diferencias en los genes podrían atribuirse a que el gen 28S no es adecuado para discernir entre taxones filogenéticamente relacionados dentro del clado de *Trichobilharzia* transmitidos por caracoles physidos, i.e. clado Q (Horák *et al.* 2012), requiriéndose además la secuenciación del gen nuclear ITS1-5.8S-ITS2, el cual sí es capaz de demostrar una topología resolutive para este clado en particular (Brant y Loker 2009; Horák *et al.* 2012; Ashrafi *et al.* 2021).

Trichobilharzia sp. 4 así mismo puede diferenciarse morfológicamente de otros esquistosomas transmitidos por physidos. Este taxón se diferencia de *T. jequitibaensis* en que este último tiene un tegumento liso en toda su extensión, excepto el canal ginecóforo, además de mayores dimensiones de la ventosa oral, acetábulo y canal ginecóforo, mayor número de testículos, y la hembra posee un ovario más largo, mayor distancia entre acetábulo y ovario, y huevos más grandes (ver Leite *et al.* 1979; Tabla 4). Se diferencia de *T. physellae* en que éste tiene una menor distancia entre la ventosa oral y acetábulo, posición de reunión cecal, un canal ginecóforo de menor longitud, mayor número de testículos y huevos de mayor tamaño (ver McMullen y Beaver 1945; Tabla 4). Así mismo pueden diferenciarse de *Trichobilharzia* sp 1 en que éste es mayor longitud, ventosa oral y acetábulo son de mayor

tamaño, además la ventosa oral presenta espinas largas en su borde anterior, distinta posición de la reunión cecal, no tiene división evidente de la vesícula seminal, su canal ginecóforo es levemente más corto, en la ubicación de la reunión cecal y que tiene un mayor número de testículos. Así mismo difiere respecto a *Trichobilharzia* sp. 3 en que éste es de mayor longitud, presenta una mayor distancia entre acetábulo y canal ginecóforo, sin división evidente de la vesícula seminal, canal ginecóforo más corto y tiene mayor número de testículos. (ver Tabla 4).

La identificación morfológica de *T. querquedulae* desde *S. cyanoptera* en el presente estudio se correspondió con las descripciones previas de McLeod (1937) y Brant y Loker (2009). No obstante, los especímenes del presente estudio mostraron algunas diferencias sutiles como una longitud parcialmente mayor del canal ginecóforo y de la vesícula seminal, una mayor distancia entre el acetábulo y canal ginecóforo, y un número inferior de testículos respecto a la descripción (180 versus 210 testículos) de los autores mencionados arriba. Además, esta identificación fue soportada mediante los análisis filogenéticos de ambos genes, con las secuencias del presente estudio siendo incluidas dentro del clado de *T. querquedulae* como un taxón conspecífico junto a otros trematodos obtenidos desde patos ali-azulados como *S. versicolor* de Argentina (Ebbs *et al.* 2016), y cerceta aliazul [*Spatula discors* (Linnaeus, 1766)] y *S. cyanoptera* de Estados Unidos (Brant y Loker 2009). El presente resultado podría considerarse esperado, teniendo en cuenta el registro previo en la misma especie, aunque en las poblaciones del hemisferio norte (Brant y Loker 2009), además del reciente hallazgo de Ebbs *et al.* (2016) quienes propusieron la distribución cosmopolita de este parásito. No obstante, representa el primer registro en Chile, ampliándose su distribución geográfica conocida en el Cono Sur, además de representar el segundo registro y un nuevo hospedero en el Neotrópico.

Szidat (1951) indicó haber encontrado un *Trichobilharzia* visceral desconocido para la ciencia desde *S. versicolor* en Tapalqué, Argentina, sin embargo, no describió al trematodo en cuestión ni tampoco en trabajos sucesivos. Considerando la ya realizada caracterización molecular de *T. querquedulae* desde la misma especie de pato y país, además de la especificidad de dicho esquistosoma hacia los patos ali-azulados (*Spatula* spp.) (Ebbs *et al.* 2016), queda la interrogante si dicha especie correspondía o no a este esquistosoma, considerando que además éste ya había sido descrito en la década del 30' por McLeod (1937).

En consecuencia, se requiere examinar el material, de haber sido depositado en alguna colección, o en caso contrario realizar nuevas colectas en la localidad tipo que Szidat (1951) menciona.

La relación filogenética entre ciertos esquistosomas viscerales y algunos hospederos aquí estudiados resulta interesante, ya que sugiere una potencial relación específica entre los taxones *Trichobilharzia* sp. 4, *Trichobilharzia* sp. A y *Trichobilharzia* sp. B y anátidos del género *Mareca*. En Chile este género es monotípico por lo que sería necesario generar secuencias adicionales desde esquistosomas provenientes de otros patos *Mareca* del mundo, como África, Asia y Europa, donde están distribuidos igualmente (Johnsgard 2010), y corroborar si efectivamente dichos taxones forman parte de este potencial clado “Wigeon”, que es el nombre común que reciben estos patos. Una relación a este nivel de especificidad se ha planteado previamente entre *T. querquedulae* y el género *Spatula* (Brant y Loker 2009; Ebbs *et al.* 2016), y se ha evidenciado también en el presente estudio entre dicho taxón y *S. cyanoptera*. Estas relaciones además se sustentan en las elevadas prevalencias y abundancias parasitarias registradas, en comparación con los demás esquistosomas descritos, e.g. 77% de prevalencia y 22,22 de abundancia media para *Trichobilharzia* sp. 4 en los patos *M. sibilatrix*, y 100% (6/6) de prevalencia y 68,83 de abundancia media para *T. querquedulae* en los patos *S. cyanoptera*, similar a lo reportado previamente para este taxón (Brant y Loker 2009; Davis *et al.* 2022). Adicionalmente, la regresión logística determinó que la abundancia de esquistosomas (*Trichobilharzia* sp. 4) fue significativamente superior en *M. sibilatrix* en comparación con el resto de los anátidos analizados. Estos elevados descriptores parasitológicos y el índice S_{TD} de valor 1, junto a las relaciones filogenéticas observadas para los genes 28S y COI, sugerirían una evidente relación de especificidad entre estos esquistosomas y sus respectivos hospederos definitivos (Poulin 2007; Poulin *et al.* 2011).

Por otro lado, una secuencia obtenida de especímenes inmaduros colectados desde *S. cyanoptera*, y no clasificados morfológicamente por la misma situación, resultó formar parte de un clado en común con *Trichobilharzia* sp. 3 en la filogenia del gen COI, sugiriendo que estos dos serían conespecíficos, lo cual además se apoyó en una distancia genética mínima, observable en taxones conespecíficos (ver Tabla 9). Sin embargo, todos los esquistosomas maduros caracterizados desde *S. cyanoptera* se correspondieron con *T. querquedulae*. Debido a este hallazgo, el índice de especificidad S_{TD} para *Trichobilharzia* sp.3 se vio

aumentado, indicando un nivel de especificidad sólo a nivel de familia (Poulin 2007). A pesar de lo anterior, esta co-infección podría considerarse accidental y no algo común entre la comunidad de esquistosomas parasitando patos del género *Spatula* ya que la totalidad de registros de *Trichobilharzia* viscerales disponibles corresponden a *T. querquedulae* (Brant y Loker 2009; Garvon *et al.* 2011; Ebbs *et al.* 2016; Davis *et al.* 2022).

Desde el punto de vista molecular, las *Trichobilharzia* spp. viscerales del presente estudio pertenecen al clado Q, el cual está conformado por esquistosomas aviáres transmitidos principalmente por caracoles de la familia Physidae como *T. querquedulae* y *T. physellae*, siendo *Trichobilharzia franki* Müller y Kimmig, 1994 la excepción que utiliza caracoles de la familia Lymnaeidae como hospederos intermediarios (Brant y Loker 2009; Brant *et al.* 2011; Horák *et al.* 2015; Ashrafi *et al.* 2021). En Sudamérica existen tres reportes previos de caracoles physidos actuando como hospederos intermediarios de la familia Schistosomatidae, todos los cuales provienen de una única especie de caracol; *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828). Dichas furcocercarias han sido catalogadas como Cercaria I, aislada en Argentina (Ostrowski de Núñez 1978), y *T. jequitibaensis* (Leite *et al.* 1979) y *Trichobilharzia* sp. en Brasil (Pinto *et al.* 2014). La familia Physidae está igualmente presente en Chile, con cuatro especies nativas y una especie invasora, *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) (Valdovinos 2006). Éste último caracol resulta además interesante ya que ha sido reportado como hospedero intermediario de *T. physellae* tanto en su distribución original, en Norteamérica (Brant *et al.* 2011), como también de forma reciente en Europa, donde el hospedero intermediario y el esquistosoma son considerados invasores (Helmer *et al.* 2021). En consecuencia, muestreos considerando a especies de esta familia podría aportar información sobre los hospederos intermediarios que participan en los ciclos biológicos de los esquistosomas aquí descritos. Respecto a la identidad específica de las furcocercarias reportadas en physidos de Sudamérica, sólo las furcocercarias de *Trichobilharzia* sp. aisladas por Pinto *et al.* (2014) han sido caracterizadas molecularmente, posicionándose igualmente dentro del clado Q, y presentándose cercanamente relacionada con las secuencias de *Trichobilharzia* sp. 3 en la filogenia de los genes COI y 28S. Dicho lo anterior, los taxones aquí descritos, i.e. *Trichobilharzia* sp. 1, *Trichobilharzia* sp. 3 y *Trichobilharzia* sp. 4, junto con las dos especies ya descritas para el neotrópico, *T. jequitibaensis* y *T. querquedulae*

(Leite *et al.* 1978, Pinto *et al.* 2014; Ebbs *et al.* 2016; presente estudio), conformarían el clado Q de Sudamérica.

La caracterización del tegumento de *T. querquedulae* con el equipo MEB resultó útil en la descripción de dicha especie. Por ejemplo, se describe la presencia de papilas circumorales, las cuales, a pesar de no haber sido descritas anteriormente en este trematodo, sí han sido previamente mencionadas en otros taxones del mismo género, como por ejemplo *Trichobilharzia australis* Blair e Islam, 1983, un esquistosoma nasal descrito originalmente en Australia, el cual también fue descrito mediante el uso de MEB (Blair e Islam 1983). Además, se evidenciaron papilas con bases amplias distribuidas sobre el tegumento en toda su extensión entre la ventosa oral a la cola. Estas mismas estructuras fueron observadas en la región entre la ventosa oral y el canal ginecóforo de *Trichobilharzia arcuata* Islam, 1986, otro esquistosoma nasal descrito en Australia (Islam 1986). Si bien las imágenes mediante MEB no son ampliamente utilizadas en la descripción de los esquistosomas aviares (e.g. Blair e Islam 1983, Islam 1986; Flores *et al.* 2021), estos hallazgos plantean la utilidad de esta herramienta en la descripción de los esquistosomas aviares adultos.

Además de los esquistosomas viscerales ya mencionados, se aisló otro género, *Dendritobilharzia*, el cual fue aislado desde el corazón, riñón y cavidad celómica de las aves. Su hallazgo en los dos primeros órganos es esperable, ya que estos esquistosomas habitan el sistema arterial de las aves (Ulmer y Vande Vusse 1970; Vande Vusse 1979, 1980), sin embargo, aquellos colectados desde la cavidad celómica podrían ser explicado por el daño causado por la munición, como los patos obtenidos mediante cacería, rompiendo vasos sanguíneos de calibre importante como la aorta, además del corazón o riñón. En el caso de los cisnes esto podría ser consecuencia de la ruptura de órganos durante la necropsia, ya que los órganos estaban friables producto de la congelación.

En relación con la diferenciación morfológica entre los machos de *Dendritobilharzia* aquí descritos se puede mencionar que: *Dendritobilharzia* sp. 1 colectado en *A. georgica* posee un cirro de aspecto lacunar, el cual no se registró en ninguno de los otros taxones aquí descritos, además los testículos son alargados y profundamente lobulados, abarcando casi todo el ancho del cuerpo hasta su extremo posterior. Mientras que en los machos de *Dendritobilharzia* sp. 2 y *Dendritobilharzia* sp. 4 los testículos son ovalados y ubicados sobre la línea media longitudinal, además *Dendritobilharzia* sp. 1 presenta dicho cirro y su apertura

genital posterior a la unión cecal, coincidiendo con *Dendritobilharzia* sp. 2, aunque este último presentó un cirro de posición sinistral, mientras que *Dendritobilharzia* sp. 4 presenta dicho órgano anterior a la unión cecal. *Dendritobilharzia* sp. 2 no pudo ser caracterizado completamente debido al pobre estado de preservación del trematodo, sin embargo, se pudieron caracterizar los órganos principales. En general, es similar a *Dendritobilharzia* sp. 1, diferenciándose en la forma del cirro y testículos como se mencionó antes, además de poseer un cuerpo menos robusto respecto al anterior y ser el taxón de menor longitud total, con un espacio intercecal más pequeño. *Dendritobilharzia* sp. 4 tiene mayores dimensiones del cuerpo y órganos en comparación con los machos de los otros taxones, exceptuando las mayores dimensiones de los testículos en *Dendritobilharzia* sp. 1. Además, presenta un cirro redondeado con un apéndice corto en su borde posterior, ubicándose a diferencia de los demás en el espacio intercecal, específicamente en el último tercio, los testículos son alargados y levemente lobulados, lo cual lo diferencia de *Dendritobilharzia* sp. 2, y su extremo posterior es redondeado, mientras que los demás taxones tenían un extremo posterior aguzado. Para *Dendritobilharzia* sp. 3 no se colectaron vermes machos.

En el caso de las hembras de *Dendritobilharzia* del presente estudio, estas sólo fueron descritas en *Dendritobilharzia* sp. 3 y *Dendritobilharzia* sp. 4. Estas se diferenciaron en que *Dendritobilharzia* sp. 3 presenta un área intercecal, distancia entre el extremo anterior y unión cecal, y distancia entre extremo anterior e inicio de vitelario más cortas, además de los huevos de menores dimensiones respecto a *Dendritobilharzia* sp. 4. Adicionalmente, y desde el punto de vista morfológico, *Dendritobilharzia* sp. 4 presentó ciegos profundamente lobulados en toda su extensión, en contraste con *Dendritobilharzia* sp. 3 que presentó lobulaciones superficiales mayoritariamente. El ovario del primer taxón es tubular y alargado, y su ootipo es dextral, mientras que en *Dendritobilharzia* sp. 3 el ovario es macizo y compacto, y el ootipo es de ubicación sinistral. El metratermo es de mayor desarrollo y recubierto por estructuras glandulares en torno a su apertura en *Dendritobilharzia* sp. 3, mientras que en *Dendritobilharzia* sp. 4 éste era más estrecho y recubierto por estructuras de tipo glandular en el lado de contacto con el esófago. Excepcionalmente algunos huevos de *Dendritobilharzia* sp. 3, específicamente el aislado en *M. sibilatrix*, presentaron una punta roma en uno de sus extremos, lo cual no forma parte de la descripción del género, ya que según Gibson *et al.* (2002) los huevos de este género son esféricos. Sin embargo, Bayssade-

Dufour *et al.* (2006) indicaron que algunos vermes de *D. pulverulenta* tenían huevos con una punta en uno de sus extremos, incluso aguzada y no roma como en el presente estudio. En contraste, Leite *et al.* (1982) no encontraron diferencias en las dimensiones de los huevos mantenidos en diferentes medios, mientras que Rind (1989) indicó que los huevos aislados desde la mucosa intestinal tenían casi el doble de diámetro respecto a los obtenidos directamente desde el útero de las hembras colectadas. Sin embargo, ninguno de estos autores mencionó diferencias en la forma de los huevos. Por otro lado, Bayssade-Dufour *et al.* (2006) plantearon que factores hormonales de las aves hospederas, y mediados por la estacionalidad, podrían influir en la morfología variable de las diferentes estructuras de este trematodo. Es importante mencionar que, para garantizar una caracterización estandarizada de los huevos en el presente estudio, sólo se midieron y caracterizaron aquellos dentro del metratermo, próximos a la apertura genital.

En comparación con la especie tipo, *D. pulverulenta*, si bien casi todas las mediciones de los vermes aquí caracterizados están dentro de los rangos de dicha especie (ver Cheatum 1941; Ulmer y Vande Vusse 1970; Freitas y Costa 1972; Vande Vusse 1980; Rind 1989; Tabla 7), se observaron diferencias morfológicas al comparar los diferentes taxones. Entre estas variaciones se pueden mencionar: la ubicación de cirro y apertura del poro genital en los machos en *Dendritobilharzia* sp. 1 y *Dendritobilharzia* sp. 2, los cuales están posterior a la unión cecal, lo cual difiere respecto a *D. pulverulenta* donde es de ubicación mucho más anterior a dicha unión, abarcando el segmento medio del área intercecal. Así mismo, *Dendritobilharzia* sp. 1 difiere en la forma lacunar de la base del cirro, mientras que en *D. pulverulenta* el cirro es simple. Los testículos de *D. pulverulenta* si bien se asemeja a *Dendritobilharzia* sp. 2 en cuanto a su organización, ubicándose en torno a la línea media longitudinal del cuerpo, varían respecto a *Dendritobilharzia* sp. 1, donde estos abarcan todo el ancho del cuerpo. La hembra de *Dendritobilharzia* sp. 3 difiere de *D. pulverulenta* por la ubicación del poro uterino, al lado izquierdo de la línea media en *D. pulverulenta*, y al lado derecho en *Dendritobilharzia* sp. 3. Sin embargo, una hembra de *D. pulverulenta* aislada desde *S. discors* y descrita por Ulmer y Vande Vusse (1970), presentó el poro uterino en el lado derecho, aunque el ovario estaba ubicado hacia el lado izquierdo, mientras que en los trematodos del presente estudio este órgano estaba situado sobre la línea media del cuerpo o levemente hacia el lado derecho de la línea media. Además, los huevos de *Dendritobilharzia*

sp. 3 son marcadamente más pequeños respecto a *D. pulverulenta*, encontrándose en el rango de medidas de *D. rionegrensis* (Martorelli 1981).

El taxón *Dendritobilharzia* sp. 4 aislado en el cisne de cuello negro es, en líneas generales, morfológicamente similar al *D. pulverulenta* de Cheatum (1941), Ulmer y Vande Vusse (1970) y Freitas y Costa (1972), aunque presentando algunas diferencias como la forma del ovario, el cual es tubular y alargado, y poro uterino de posición dextral en *Dendritobilharzia* sp. 4, mientras que en *D. pulverulenta* el ovario es compacto y de asas anchas, y el poro uterino es de ubicación sinistral. Así mismo, el primer taxón presenta un útero de mayor longitud respecto al segundo. No obstante, la hembra descrita por Cheatum (1941) presentó un poro uterino dextral, similar a *Dendritobilharzia* sp. 4, aunque la ubicación del cirro y poro genital del macho es distinta del taxón aquí aislado, con una posición posterior a la unión cecal en la descripción de Cheatum (1941), mientras que estos están anterior a dicha unión en *Dendritobilharzia* sp. 4.

La otra especie registrada en Sudamérica, *D. rionegrensis* es distinta de los trematodos descritos en el presente estudio en las siguientes características: hembra con un ovario más largo, distancia más corta entre extremo anterior y poro uterino, región cecal y esófago más largos y ootipo de posición central. En el caso de los machos, *D. rionegrensis* se diferencia de los taxones aquí descritos en que presenta un cirro y poro genital de posición sinistral, aunque coincidiendo en esto con *Dendritobilharzia* sp. 2, el primer testículo aparece a la altura de la unión cecal, mientras que en los demás taxones aparece a corta o mediana distancia posterior a dicha unión (ver Martorelli 1981; Tabla 7).

Los análisis filogenéticos de las secuencias aquí generadas para *Dendritobilharzia* variaron según el gen. En la topología del gen COI, *Dendritobilharzia* sp. 1 y *Dendritobilharzia* sp. 4 corresponderían a un taxón conespecífico y a la vez hermana de *D. pulverulenta*, esto a pesar de las mayores similitudes observadas entre *Dendritobilharzia* sp. 4 y *D. pulverulenta*. Dicho eso, se plantea una postura reservada respecto a la identidad específica de los trematodos aislados en el presente estudio. En el caso del gen 28S, las secuencias de *Dendritobilharzia* sp. 1, *Dendritobilharzia* sp. 2 y *Dendritobilharzia* sp. 4 formaron un clado monofilético con *D. pulverulenta*, y por lo tanto todos serían conespecíficos, a pesar de las diferencias morfológicas. Esta variación en la topología de estos taxones podría deberse a la falta de poder resolutivo del gen 28S para este clado en

particular, requiriéndose además los análisis filogenéticos del gen ITS, el cuál sí otorga la resolución necesaria para este grupo de parásitos (Brant *et al.* 2011; Dolka *et al.* 2015). El taxón *Dendritobilharzia* sp. 3 no pudo caracterizarse molecularmente ya que todos los intentos por amplificar los genes 28S y COI resultaron infructuosos. La naturaleza de esto es desconocida, sin embargo, nuevos intentos con el gen ITS podrían entregar mejores resultados.

Es necesario destacar las marcadas diferencias en la morfología y morfometría de los especímenes de *D. pulverulenta* en las descripciones originales y re-descripciones, con diferencias superiores a tres veces en las medidas de algunos órganos (ver Cheatum 1941; Ulmer y Vande Vusse 1970; Freitas y Costa 1972; Vande Vusse 1980), además del gran abanico de hospederos definitivos, incluyendo tres órdenes de aves distintos (Podicipediformes, Gruiformes y Anseriformes) y más de 20 especies de anátidos (Vande Vusse 1979, 1980; Horák *et al.* 2015). Debido a lo anterior y junto al reducido número de secuencias disponibles en GenBank (Brant *et al.* 2011; Dolka *et al.* 2015), y ante la ausencia de secuencias provenientes de Sudamérica con las cuales comparar, es posible que esta gran variación observada en los trematodos sea consecuencia de que esta especie corresponda a un complejo de especies crípticas. Esto ha ocurrido con otros taxones como *Echinostoma revolutum* sensu lato, el cual se consideraba una sola especie ampliamente distribuida, y resultó ser más de 10 especies diferentes desde el punto de vista molecular (Kostadinova y Gibson 2000; Georgieva *et al.* 2014).

Otra postura respecto a la morfología variable de *D. pulverulenta* sería que éste es un parásito pleomórfico, lo cual ocurriría por la influencia de diversos factores propios de los hospederos de este parásito, por lo que trematodos que parecieran corresponder a especies distintas, desde el punto de vista morfológico, corresponderían a una misma especie (Bayssade-Dufour *et al.* 2006). Dicho eso, si se desea una identificación específica de este género, se requeriría del uso de herramientas moleculares, especialmente del gen ITS para lograr esto.

El ciclo de *Dendritobilharzia* es considerado dulceacuícola, con caracoles planorbidos de los géneros *Anisus* en Europa, *Gyraulus* en Norteamérica y *Biomphalaria* Preston, 1910 en Sudamérica actuando como sus hospederos intermediarios (Leite *et al.* 1982; Brant *et al.* 2011; Horák *et al.* 2015). En Chile la familia Planorbidae está compuesta

por 11 especies, pertenecientes a los géneros *Biomphalaria*, *Uncancylus* y *Ancylus*. De estos, *Biomphalaria* es el más diverso, con 7 especies distribuidas principalmente entre las zonas centro-sur y sur del país (Valdovinos 2006; Fuentealba *et al.* 2010), por lo que futuros muestreos en dichas áreas podría ayudar a dilucidar los ciclos biológicos de los taxones de *Dendritobilharzia* presentes en territorio nacional.

Entre los esquistosomas nasales se encontraron dos taxones; *N. melancorhypha* en *C. melancoryphus* y *Trichobilharzia* sp. 2 en *A. flavirostris*, los cuales fueron aislados desde pequeños vasos sanguíneos asociados a la mucosa nasal. La descripción morfológica como morfométrica de los especímenes aquí colectados, identificados como *N. melancorhypha*, está conforme a lo propuesto en la descripción original de Flores *et al.* (2021) (ver Tabla 6), aunque presentando algunas diferencias sutiles como un acetábulo más pequeño, una distancia levemente mayor entre la ventosa oral y el acetábulo, longitud mayor de la vesícula seminal y un canal ginecóforo algo más reducido en su longitud. La reducción del tamaño en algunas estructuras podría deberse a que estos fueron fijados en etanol, mientras que varios de los especímenes descritos por Flores *et al.* (2021) fueron medidos en material no fijado. Adicionalmente, en las filogenias de los genes 28S y COI, las secuencias obtenidas conformaron un clado monofilético junto a una secuencia de *N. melancorhypha* del mismo hospedero proveniente de Argentina, dando soporte así al diagnóstico morfológico. Además, dentro de este mismo clado se encontraron otras secuencias de furcocercarias liberadas por caracoles *Chilina* provenientes de Argentina (furcocercaria linaje 1) (Flores *et al.* 2015), y otras encontradas en *Chilina dombeyana* Sowerby, 1838 (Chilinidae) de Chile (furcocercaria Linaje I) (ver capítulo I). Dicho lo anterior, la confirmación de *N. melancorhypha* parasitando a *C. melancoryphus* en Chile junto a la descripción de sus estadios larvarios en *C. dombeyana* (ver capítulo I), plantearía que este taxón corresponde al primer esquistosoma en Chile cuyo ciclo biológico ha sido dilucidado.

El hallazgo de *N. melancorhypha* extiende la distribución geográfica originalmente descrita en Argentina por Flores *et al.* (2021), al centro y sur de Chile, manteniéndose hasta ahora como una especie monotípica. Esto resulta interesante, ya que tanto sus hospederos intermediarios, caracoles del género *Chilina*, como el hospedero definitivo son todos endémicos de Sudamérica (Fuentealba *et al.* 2010; Martínez y González 2017), planteando la posibilidad de un género exclusivo del continente Sudamericano, en contraste con su símil

Allobilharzia Kolářová, Rudolfová, Hampl y Skírnisson, 2006, el cual parasita exclusivamente a cisnes del hemisferio norte, encontrándose en Norteamérica, Europa y Asia (Kolářová *et al.* 2006; Brant 2007; Hayashi *et al.* 2017). Además, el cisne de cuello negro es el único cisne presente en Sudamérica (Johnsgard 2010), lo cual pareciera limitar la posibilidad de parasitar a otros anátidos, en caso de resultar específico del género *Cygnus* Bechstein, 1803. En el caso del llamado cisne coscoroba [*Coscoroba coscoroba* (Molina, 1782)] este no corresponde a un cisne verdadero, sino más bien es un representante de los gansos neotropicales junto a otros géneros como *Chloephaga* Eyton, 1838 y *Oressochen* Bannister, 1870 (Johnsgard 2010; Martínez y González 2017), por lo que futuros estudios relacionados a la fauna de esquistosomas aviares podrían revelar la presencia de algún taxon del género *Anserobilharzia* Brant, Jouet, Ferte y Loker, 2013, el cual se plantea como específico de gansos (Brant y Loker 2009; Brant *et al.* 2013).

El otro esquistosoma aviar nasal fue *Trichobilharzia* sp. 2, el cual no pudo ser caracterizado molecularmente ya que sólo se pudo colectar un verme, y basado en intentos previos sin éxito para la obtención de ADN desde un solo esquistosoma con el kit disponible, es que se optó sólo por su caracterización morfológica. *Trichobilharzia* sp. 2 se describió en base a un verme incompleto por lo que no se pudieron observar algunos órganos como la vesícula seminal, número total de testículos ni cola. La mayoría de las mediciones obtenidas están dentro del rango de otros esquistosomas nasales reportados en el mundo (ver Tabla 5). Sin embargo, se observaron algunas diferencias morfométricas respecto a los demás taxones, como por ejemplo una corta distancia entre el canal ginecóforo y el primer testículo, y el reducido número de testículos además de un canal ginecóforo corto, aunque esto resultó similar a lo observado para *Trichobilharzia rodhaini* Fain, 1955 de África, *T. australis* de Australia y *Trichobilharzia novaeseelandiae* Davis, Blair y Brant, 2022 de Nueva Zelanda. A pesar de la similitud en la longitud del canal, el taxón aislado es distinto de estos tres esquistosomas, ya que posee un tegumento (exceptuando ventosas y canal ginecóforo) cubierto de pequeñas espinas en toda su superficie, a diferencia de un tegumento rugoso (*T. novaeseelandiae*), poroso (*T. australis*) o liso (*T. rodhaini*) (Fain 1956; Blair e Islam 1983; Davis *et al.* 2022).

Fuera de las Américas hay reportes previos de esquistosomas nasales parasitando anátidos como por ejemplo *Trichobilharzia regenti* Horák, Kolářová y Dvořák, 1998 en

Europa (Horák *et al.* 1998; Skírnisson *et al.* 2012), *Trichobilharzia nasicola* Fain, 1955, *Trichobilharzia spinulata* Fain, 1955 y *Trichobilharzia duboisi* Fain, 1959 en África (Fain 1955, 1956, 1959), y así mismo en Oceanía con los taxones *T. arcuata*, *T. australis* y *T. novaeseelandiae* (Blair e Islam 1983; Islam 1986; Davis *et al.* 2022). Es así que *Trichobilharzia* sp. 2 correspondería al primer registro de un esquistosoma nasal del género *Trichobilharzia* reportado en el Neotrópico, por lo que futuros esfuerzos deben realizarse con tal de coleccionar material suficiente para una caracterización morfológica completa como también lograr su caracterización molecular, y así poder establecer su posición filogenética en el árbol del clado DAS de esquistosomas aviares, donde este grupo de parásitos están organizados como clado (Davis *et al.* 2022), y que por lo tanto se espera que el presente taxón también esté posicionado.

Adicionalmente, un esquistosoma aviar visceral no descrito morfológicamente, Schistosomatidae sp., se aisló desde el hígado de los cisnes de cuello negro. Desafortunadamente, y debido al pobre estado de preservación de los segmentos de trematodos, ya que todos provenían de aves congeladas, no se pudieron describir dichos vermes, quedando pendiente su caracterización morfológica y morfométrica. Con base en su posición filogenética, como un clado independiente dentro del gran clado aviar DAS, este taxón formó un clado monofilético, con un soporte robusto para 28S y COI, con otros esquistosomas aislados desde caracoles *Chilina* en Argentina y Chile (Flores *et al.* 2015; ver capítulo I). Los miembros de este clado tienen el potencial de corresponder a un género nuevo, ya que no forman parte de ningún otro clado de algún género conocido, tal como se sugirió en capítulo I. Así, se indicaría al cisne de cuello negro como el hospedero definitivo del Linaje II aislado desde *C. dombeyana* en Chile (capítulo I) y linaje 2 desde *Chilina fulgurata* Pilsbry, 1911, *Chilina gibbosa* Pilsbry, 1911 y *Chilina perrieri* Mabilie, 1884 (Chiliniidae) en Argentina (Flores *et al.* 2015), constituyendo un nuevo esquistosoma visceral neotropical y el tercero reportado para *C. melancoryphus*, teniendo en consideración a *N. melancorhypha* y *Dendritobilharzia* sp. 4.

Debido a que los esquistosomas viscerales se encuentran habitualmente en el sistema venoso de las aves, distribuyéndose entre los órganos parenquimatosos como el hígado y los vasos sanguíneos mesentéricos (Horák *et al.* 2015; Ashrafi *et al.* 2021), es probable que los esquistosomas intestinales mencionados por Oyarzún-Ruiz *et al.* (2019) en los cisnes de

cuello negro del sur de Chile correspondan a este taxón. Si bien no se registraron esquistosomas en el intestino de los cisnes necropsiados, esto podría explicarse por el pobre estado de preservación de dichas carcasas que además fueron congeladas, lo cual alteraría la integridad de estos platelmintos (Lutz *et al.* 2017). La necropsia de cisnes recién eutanasiados o encontrados muertos sin mayores cambios autolíticos permitiría la obtención de un material de mejor calidad para la caracterización de estos trematodos.

La no visualización de algunas estructuras anatómicas como la reunión cecal y túbulos del sistema reproductivo de las hembras, probablemente ocurrió porque se utilizó un microscopio óptico estándar. A esto se suma el pobre estado de preservación de algunos parásitos colectados, ahondando dicha falencia. Diferentes autores recomiendan el uso de un microscopio con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC; Nomarski) para la observación de estructuras pequeñas en estos parásitos. Incluso con estos microscopios, los trematodos podrían ser montados directamente en solución salina para su caracterización (Kolářová *et al.* 2006, 2010; Skírnisson *et al.* 2012; Ashrafi *et al.* 2021). Además, en el presente estudio no se logró una adecuada caracterización de los huevos de esquistosomas aviáres, esto probablemente asociado a lo delgada que es la cáscara de éstos (Skírnisson *et al.* 2012; Flores *et al.* 2021), los cuales colapsan fácilmente ante el uso de etanol, que fue utilizado para la fijación, preservación y tinción de los trematodos (Lutz *et al.* 2017). Por lo tanto, y para poder evitar estas complicaciones, sería conveniente realizar exámenes coproparasitarios de las aves a necropsiar, utilizando por ejemplo el método de Kato-Katz, el cual ya está estandarizado en la colecta de huevos de esquistosomas viscerales, evitando la deformación de estos y permitiendo caracterizarlos de forma adecuada (Katz *et al.* 1971; Horák *et al.* 2012, 2015). En el caso de los esquistosomas nasales, el método estándar sigue siendo la cuidadosa revisión de la mucosa nasal para encontrar los huevos en dicho tejido o también realizar lavados nasales con solución salina con el cual se pueden recuperar huevos y miracidios (Horák *et al.* 2012, 2015; Flores *et al.* 2021).

Los patos y cisnes no compartieron taxones de esquistosomas aviáres, confirmando la hipótesis planteada en este estudio, y entregando evidencia adicional a la propuesta de Brant y Loker (2009) sobre la especificidad de ciertos esquistosomas hacia sus hospederos definitivos. En el caso del género *Dendritobilharzia*, y ante la incertidumbre en la identidad de los vermes, según lo discutido más arriba, se prefiere una postura reservada respecto a su

identidad específica, por lo cual, y de momento, no se puede establecer que este taxón sea compartido entre los dos grupos de anátidos.

Futuros esfuerzos para coleccionar esquistosomas aviarios en el Neotrópico deberían considerar, además de especies anátidas no estudiadas, otros grupos que no han sido parte del foco central de atención en este grupo de trematodos, como lo son Suliformes (aningas, cormoranes), Charadriiformes (gaviotas, gaviotines, aves playeras), Phoenicopteriformes (flamencos y parinas) y Passeriformes (específicamente aquellos pájaros asociados a cuerpos de agua como humedales), todos los cuales han sido reportados como hospederos de esquistosomas aviarios (Paré y Black 1999; Brant 2007; Horák y Kolářová 2011; Flores *et al.* 2015; Horák *et al.* 2015). Si bien estos grupos de aves han sido registrados como hospederos definitivos, varios de estos registros corresponden a trabajos clásicos sin mayores análisis filogenéticos, por lo que no se ha logrado entender del todo las relaciones evolutivas de los esquistosomas que albergan (Horák y Kolářová 2011). Como ejemplo de esto se puede mencionar a *Macrobilharzia* Travassos, 1922, esquistosoma basal y de posición intermedia entre los esquistosomas aviarios marinos y dulceacuícolas, conocido por parasitar aningas [*Anhinga anhinga* (Linnaeus, 1766); Suliformes], sin embargo, solo tres secuencias están disponibles en GenBank originadas de un único estudio en Norteamérica (Brant *et al.* 2006). Mientras que, en Sudamérica, donde se describió dicho parásito en el mismo hospedero (Travassos *et al.* 1969), no hay secuencias disponibles. Otro ejemplo, y reciente, es el de Lorenti *et al.* (2022), quienes demostraron que inclusive la investigación en especies comunes puede dar luces sobre la sistemática de los esquistosomas no solo del Neotrópico, sino de taxones de amplia distribución. En dicho trabajo, las autoras muestrearon gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus* Lichtenstein, 1823) y gaviotas cáhuil (*Chroicocephalus maculipennis* Lichtenstein, 1823), ambas especies comunes en las costas de Sudamérica, y lograron describir dos nuevos géneros de esquistosomas aviarios, además de ayudar a desenredar la complicada sistemática de otro género pobremente conocido y de amplia distribución global, *Gigantobilharzia* Odhner, 1910.

Teniendo en consideración que sólo dos países concentran la mayoría de los registros de esquistosomas aviarios, tanto desde el punto de vista morfológico como molecular (ver Pinto *et al.* 2014, 2017; Flores *et al.* 2015, 2021; Brant *et al.* 2017; Lorenti *et al.* 2022), es menester ampliar los esfuerzos y replicarlos en otros países Sudamericanos, lo cual podría

ayudar a comprender mejor diferentes aspectos de este grupo de parásitos sumamente desatendidos, no sólo desde su biodiversidad sino también sus relaciones evolutivas.



6. REFERENCIAS

- Agüero ML, Gilardoni C, Cremonte F, Diaz JI (2016) Stomach nematodes of three sympatric species of anatid birds off the coast of Patagonia. *J Helminthol* 90:663–667. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000899>
- Ashrafi K, Sharifdini M, Darjani A, Brant SV (2021) Migratory routes, domesticated birds and cercarial dermatitis: the distribution of *Trichobilharzia franki* in Northern Iran. *Parasite* 28:4. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020073>
- Bayssade-Dufour C, Jouet D, Rudolfova J, *et al* (2006) Seasonal morphological variations in bird schistosomes. *Parasite* 13:205–214. <https://doi.org/10.1051/parasite/2006133205>
- Blair D, Islam KS (1983) The life-cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Syst Parasitol* 5:89–117. <https://doi.org/10.1007/BF00049237>
- Brant SV, Morgan JAT, Mkoji GM, *et al* (2006) An approach to revealing blood fluke life cycles, taxonomy, and diversity: provision of key reference data including DNA sequence from single life cycle stages. *J Parasitol* 92:77–88. <https://doi.org/10.1645/GE-3515.1>
- Brant SV (2007) The occurrence of the avian schistosome *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl et Skírnisson, 2006 (Schistosomatidae) in the tundra swan, *Cygnus columbianus* (Anatidae), from North America. *Folia Parasitol* 54:99–104. <https://doi.org/10.14411/fp.2007.013>
- Brant SV, Loker ES (2009) Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *J Parasitol* 95:941–963. <https://doi.org/10.1645/GE-1870.1>
- Brant SV, Bochte CA, Loker ES (2011) New Intermediate Host Records for the Avian Schistosomes *Dendritobilharzia pulverulenta*, *Gigantobilharzia huronensis*, and *Trichobilharzia querquedulae* From North America. *J Parasitol* 97:946–949. <https://doi.org/10.1645/GE-2743.1>
- Brant SV, Jouet D, Ferte H, Loker ES (2013) *Anserobilharzia* gen. n. (Digenea, Schistosomatidae) and redescription of *A. brantae* (Farr & Blankemeyer, 1956) comb.

- n. (syn. *Trichobilharzia brantae*), a parasite of geese (Anseriformes). *Zootaxa* 3670:193–206. <https://doi.org/10.11646.zootaxa.3670.2.5>
- Brant SV, Loker ES, Casalins L, Flores V (2017) Phylogenetic Placement of a Schistosome from an Unusual Marine Snail Host, the False Limpet (*Siphonaria lessoni*) and Gulls (*Larus dominicanus*) from Argentina with a Brief Review of Marine Schistosomes from Snails. *J Parasitol* 103:75–82. <https://doi.org/10.1645/16-43>
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83:575–583. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2307/3284227>
- Cheatum EL (1941) *Dendritobilharzia anatinarum* n. sp., a blood fluke from the mallard. *J Parasitol* 27:165–170. <https://doi.org/10.2307/3272661>
- Christiansen A, Olsen A, Buchmann K, et al (2016) Molecular diversity of avian schistosomes in Danish freshwater snails. *Parasitol Res* 115:1027–1037. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4830-3>
- CONAF (2019) Informe Monitoreo Avifauna Abril 2019. Valdivia, Chile.
- Davis NE, Blair D, Brant SV (2022) Diversity of *Trichobilharzia* in New Zealand with a new species and a redescription, and their likely contribution to cercarial dermatitis. *Parasitology*. Aceptado. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001943>
- Dolka I, Dolka B, Żbikowski A, Szeleszczuk P (2015) Vascular hypertrophy related to schistosomiasis in a mute swan in Poland. *J Comp Pathol* 152:85. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.10.178>
- Ebbs ET, Loker ES, Davis NE, et al (2016) Schistosomes with wings: how host phylogeny and ecology shape the global distribution of *Trichobilharzia querquedulae* (Schistosomatidae). *Int J Parasitol* 46:669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.04.009>
- Fain A (1955) Recherches sur les Schistosomes d'Oiseaux au Ruanda-Urundi (Congo belge) Découverte d'une nouvelle bilharziose aviaire. La trichobilharziose nasale, le description de Schistosomes nouveaux. *Rev Zool Bot Africaines* 51:373–387.
- Fain A (1956) Les schistosomes d'oiseaux du genre *Trichobilharzia* Skrjabin et Zakharov, 1920 au Ruanda Urundi. *Rev Zool Bot Africaines* 54:147–178.

- Fain A (1959) Un nouveau schistosome du genre *Trichobilharzia* dans les fosses nasales du canard nain. *Rev Zool Bot Africaines* 60:227–232.
- Farley J (1971) A Review of the Family Schistosomatidae: Excluding the Genus *Schistosoma* from Mammals. *J Helminthol* 45:289–320. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00000572>
- Flores V, Brant SV, Loker ES (2015) Avian schistosomes from the South American endemic gastropod genus *Chilina* (Pulmonata: Chiliniidae), with a brief review of South American schistosome species. *J Parasitol* 101:565–576. <https://doi.org/10.1645/14-639>
- Flores V, Viozzi G, Casalins L, *et al* (2021) A new Schistosome (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal tissue of South America black-necked swans, *Cygnus melancoryphus* (Anatidae) and the endemic pulmonate snail *Chilina gibbosa*. *Zootaxa* 4948:404–418. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4948.3.5>
- Freitas MG, Costa HM de A (1972) *Dendritobilharzia anatarum* Cheatum, 1941 em pato doméstico, no Brasil (Trematoda, Schistosomatidae). *Rev Bras Biol* 32:343–345.
- Fuentealba C, Figueroa R, Morrone JJ (2010) Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Rev Chil Hist Nat* 83:289–298. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2010000200009>
- Garvon JM, Fedynich AM, Peterson MJ, Pence DB (2011) Helminth Community Dynamics in Populations of Blue-Winged Teal (*Anas discors*) Using Two Distinct Migratory Corridors. *J Parasitol Res* 2011:306257. <https://doi.org/10.1155/2011/306257>
- Georgieva S, Faltýnková A, Brown R, *et al* (2014) *Echinostoma* “*revolutum*” (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. *Parasit Vectors* 7:520. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0520-8>
- Gibson DI, Jones A, Bray RA (2002) *Keys to the Trematoda, Volume 1*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London, UK.
- Hayashi K, Ichikawa-Seki M, Ohari Y, *et al* (2017) First detection of *Allobilharzia visceralis* (Schistosomatidae, Trematoda) from *Cygnus cygnus* in Japan. *Parasitol Int* 66:925–929. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.015>

- Helmer N, Blatterer H, Hörweg C, *et al* (2021) First Record of *Trichobilharzia physellae* (Talbot, 1936) in Europe, a Possible Causative Agent of Cercarial Dermatitis. *Pathogens* 10:1473. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111473>
- Horák P, Kolářová L, Dvořák J (1998) *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5:349–357. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(98\)80310-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(98)80310-3)
- Horák P, Kolářová L (2011) Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshw Biol* 56:779–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02545.x>
- Horák P, Schets FM, Kolářová L, Brant SV (2012) *Trichobilharzia*. In: Liu D (ed) *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. Taylor and Francis, CRC Press, Boca Raton, USA, pp 455–465.
- Horák P, Mikeš L, Lichtenbergová L, *et al* (2015) Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clin Microbiol Rev* 28:165–190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-14>
- Islam KS (1986) The morphology and life-cycle of *Trichobilharzia arcuata* n. sp. (Schistosomatidae: Bilharziellinae) a nasal schistosome of water whistle ducks (*Dendrocygna arcuata*) in Australia. *Syst Parasitol* 8:117–128. <https://doi.org/10.1007/BF00009868>
- Johnsgard P (2010) *Ducks, Geese and Swans of the world, Revised ed.* University of Nebraska Press, Nebraska.
- Jouet D, Ferté H, Hologne C, *et al* (2009) Avian schistosomes in French aquatic birds: a molecular approach. *J Helminthol* 83:181–189. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09311712>
- Katz N, Chaves A, Pellegrino JP (1971) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14:397–400.
- Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S (2014) Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci* 6:81–85. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>
- Kolářová L, Rudolfová J, Hampl V, Skírnisson K (2006) *Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae). *Parasitol Int* 55:179–186. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.009>

- Kolářová L, Horák P, Skírnisson K (2010) Methodical approaches in the identification of areas with a potential risk of infection by bird schistosomes causing cercarial dermatitis. *J Helminthol* 84:327–35. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09990721>
- Kostadinova A, Gibson D (2000) The systematics of the echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK (eds) *Echinostomes as experimental models for biological research*. Springer Science+Business Media, B. V., USA, pp 31–58.
- Leite ACR, Costa HM de A, Costa JO (1978) *Trichobilharzia jequitibaensis* sp. n. (Trematoda, Schistosomatidae) in *Cairina moschata domestica* (Anatidae). *Rev Bras Biol* 38:843–846.
- Leite ACR, Costa HM de A, Costa JO (1979) The life cycle of *Trichobilharzia jequitibaensis* Leite, Costa and Costa, 1978 (Trematoda: Schistosomatidae). *Rev Bras Biol* 39:341–345.
- Leite ACR, Costa HM de A, Costa JO, *et al* (1982) The life cycle of *Dendritobilharzia anatinarum* cheatum, 1941 (Trematoda, Schistosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 77:389–396. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761982000400005>
- Lorenti E, Brant S V, Gilardon C, *et al* (2022) Two new genera and species of avian schistosomes from Argentina with proposed recommendations and discussion of the polyphyletic genus *Gigantobilharzia* (Trematoda, Schistosomatidae). *Parasitology*. Aceptado. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000130>
- Lutz HL, Tkach VV., Weckstein JD (2017) Methods for Specimen-based Studies of Avian Symbionts. In: Webster MS (ed) *The Extended Specimen: Emerging Frontiers in Collections-based Ornithological Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 157–183.
- Martínez D, González G (2017) *Aves De Chile: Guía de Campo y breve Historia Natural*. Ediciones del Naturalista, Santiago, Chile.
- Martorelli SR (1981) *Dendritobilharzia rionegrensis* sp. nov. (Digenea: Schistosomatidae) parásita de las venas mesentéricas de *Fulica rufifrons* (Aves Rallidae). *Neotropica* 27:171–177.
- McDonald M (1981) *Key to trematodes reported in waterfowl*. Fish and Wildlife Service U.S. Department of the Interior, Resource publication 142, Washington D. C.
- McLeod JA (1937) Two new schistosomid trematodes from water-birds. *J Parasitol* 23:456–466. <https://doi.org/10.2307/3272392>

- McLeod JA, Little GE (1942) Continued studies on cercarial dermatitis and the trematode family Schistosomatidae in Manitoba. Part I. *Can J Res* 20:170–181. <https://doi.org/10.1139/cjr42d-015>
- McMullen DB, Beaver PC (1945) Studies on schistosome dermatitis IX. The life cycles of three dermatitis-producing schistosomes of birds and a discussion of the subfamily Bilharziellinae (Trematoda: Schistosomatidae). *Am J Epidemiol* 42:128–154. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119030>
- Ostrowski de Núñez M (1978) Fauna de agua dulce de la República Argentina. VII. Cercarias de la familia Schistosomatidae (Trematoda, Digenea). *Rev del Mus Argentino Ciencias Nat “Bernardino Rivadavia” e Inst Investig las Ciencias Nat* 2:65–76.
- Oyarzún-Ruiz P, Muñoz P, Paredes E, *et al* (2019) Gastrointestinal helminths and related histopathological lesions in black-necked swans *Cygnus melancoryphus* from the Carlos Anwandter Nature Sanctuary, Southern Chile. *Rev Bras Parasitol Vet* 28:613–624. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019063>
- Oyarzún-Ruiz P, González-Acuña D (2021) Checklist and state of knowledge of helminths in wild birds from Chile: an update. *Austral J Vet Sci* 53:63–72. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322021000100063>
- Paré JA, Black SR (1999) Schistosomiasis in a Collection of Captive Chilean Flamingos (*Phoenicopterus chilensis*). *J Avian Med Surg* 13:187–191.
- Pinto HA, Brant SV, Melo AL de (2014) *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as a natural intermediate host of *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae), a potential causative agent of avian cercarial dermatitis in Brazil. *Acta Trop* 138:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.002>
- Pinto HA, Pulido-Murillo EA, de Melo AL, Brant SV (2017) Putative new genera and species of avian schistosomes potentially involved in human cercarial dermatitis in the Americas, Europe and Africa. *Acta Trop* 176:415–420. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.016>
- Poulin R (2007) *Evolutionary Ecology of Parasites*, 2nd edn. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Poulin R, Krasnov BR, Mouillot D (2011) Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends Parasitol* 27:355–361. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.05.003>

- Rind S (1989) *Dendritobilharzia pulverulenta* (Trematoda: Schistosomatidae) in New Zealand. *New Zeal J Zool* 16:215–220. <https://doi.org/10.1080/03014223.1989.10422571>
- SAG (2017) *Ley N°19.473 y su Reglamento*. Servicio Agrícola y Ganadero, Gobierno de Chile.
- Schell SC (1985) *Handbook of Trematodes of North America, North of Mexico*. University Press of Idaho, Idaho.
- Skírnisson K, Kolářová L, Horák P, *et al* (2012) Morphological features of the nasal blood fluke *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae, Digenea) from naturally infected hosts. *Parasitol Res* 110:1881–1892. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2713-9>
- Szidat L (1951) Cercarias schistosomicas y dermatitis schistosomica humana en la República Argentina. *Comun del Inst Nac Investig las Ciencias Nat* 2:129–150.
- Tkach V, Pawlowski J, Mariaux J (2000) Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 30:83–93. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00163-0)
- Travassos L, Teixeira de Freitas JF, Kohn A (1969) Trematódeos do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 67:1–886
- Ulmer MJ, Vande Vusse FJ (1970) Morphology of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Braun, 1901) Skrjabin, 1924 (Trematoda: Schistosomatidae) with notes on secondary hermaphroditism in males. *J Parasitol* 56:67–74. <https://doi.org/10.2307/3277455>
- Valdovinos C (2006) Estado de conocimiento de los Gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70:88–95. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100014>
- Vande Vusse FJ (1979) Host-Parasite Relations of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Trematoda: Schistosomatidae) and Anatis. *J Parasitol* 65:894–897. <https://doi.org/10.2307/3280244>
- Vande Vusse FJ (1980) A review of the genus *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow 1920 (Trematoda: Schistosomatidae). *J Parasitol* 66:814–822. <https://doi.org/10.2307/3280675>
- Vanstreels RET, Gardiner CH, Yabsley MJ, *et al* (2018) Schistosomes and Microfilarial Parasites in Magellanic Penguins. *J Parasitol* 104:322–328. <https://doi.org/10.1645/17-154>

7. CONCLUSIONES

- i. Se identificaron tres linajes distintos de furcocercarias caracterizados morfológica como molecularmente. Una de estas correspondió a un taxón recientemente descrito desde el cisne de cuello negro, *Nasusbilharzia melancorhypha*, en Argentina.
- ii. Los esquistosomas aviares aislados fueron descritos morfológica como molecularmente, identificándose un total de cinco taxones distintos pertenecientes al género *Trichobilharzia*, cuatro al género *Dendritobilharzia*, una para *Nasusbilharzia*, además de un taxón pendiente de ser descrito morfológicamente (Schistosomatidae sp.).
- iii. Las cinco especies de anátidos considerados en el estudio resultaron parasitadas con al menos un taxón de esquistosoma aviar visceral y/o nasal. En el caso de los caracoles dulceacuícolas, de las cinco especies colectadas solo *Chilina dombeyana* (Chiliniidae) resultó ser el hospedero intermediario de estos trematodos.
- iv. Las furcocercarias de esquistosomas aviares en *Chilina dombeyana* presentaron una prevalencia de 1,09% con una abundancia media de 5,45 furcocercarias en los caracoles muestreados. Mientras que en los esporoquistes la prevalencia fue de 1,53%.
- v. De los 11 esquistosomas aviares aislados, *Trichobilharzia querquedulae* y *Trichobilharzia* sp. 4 presentaron los mayores descriptores parasitológicos con una prevalencia y abundancia media de 100% y 68,83, y 77,78% y 22,22, respectivamente.
- vi. Se determinó una asociación positiva y significativa entre la longitud de la concha de los caracoles *C. dombeyana* y los descriptores de prevalencia y abundancia media, con caracoles de mayor talla liberando una mayor cantidad de furcocercarias y con mayor posibilidad de encontrarse parasitados.
- vii. Se determinó una asociación positiva y significativa entre la especie *Mareca sibilatrix* y los descriptores de prevalencia y abundancia media, albergando una mayor carga parasitaria y con una mayor prevalencia respecto a las demás especies de aves. Los factores de edad y sexo no resultaron significativos.
- viii. Se determinó mediante el índice S_{TD} que *C. dombeyana* correspondería al único hospedero de los tres linajes aislados, al menos en el presente estudio.

- ix. En el caso de las aves, las asociaciones *Trichobilharzia* sp. 4-*M. sibilatrix*, *Trichobilharzia querquedulae-Spatula cyanoptera* y *N. melancorhypha-Cygnus melancoryphus* se indicaron como específicas, en base al índice S_{TD} , relaciones filogenéticas con taxones cercanos, prevalencia y abundancia media de cada uno.

