



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Parasitación de *Cornu aspersum* Müller, 1774
(Helicidae) por metacercarias del género *Brachylaima*
sensu lato Dujardin, 1843 (Brachylaimidae): tratamiento
antihelmíntico y consumo humano**

Laia Gállego Franco

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
(Dra. Mercedes Gracenea Zugarramurdi)

PARASITACIÓN DE *CORNU ASPERSUM* MÜLLER, 1774 (HELICIDAE) POR
METACERCARIAS DEL GÉNERO *BRACHYLAIMA SENSU LATO* DUJARDIN,
1843 (BRACHYLAIMIDAE): TRATAMIENTO ANTIHELMÍNTICO Y
CONSUMO HUMANO

LAIA GÁLLEGO FRANCO 2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE
MEDICAMENTS

PARASITACIÓN DE *CORNU ASPERSUM* MÜLLER, 1774 (HELICIDAE) POR
METACERCARIAS DEL GÉNERO *BRACHYLAIMA SENSU LATO* DUJARDIN,
1843 (BRACHYLAIMIDAE): TRATAMIENTO ANTIHELMÍNTICO Y
CONSUMO HUMANO

Memòria presentada per Laia Gállego Franco per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Dra. Mercedes Gracenea Zugarramurdi

Laia Gállego Franco

Dra. Mercedes Gracenea Zugarramurdi

LAIA GÁLLEGO FRANCO 2017

この世に悪があるとすればそれは人の心だ。
五反田義治

Truly, if there is evil in this world, it lies within the heart of mankind.

Yoshiharu Gotanda

Índice

PREFACIO	1
RESUMEN	3
PREÁMBULO	7
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	9
1.1. El género <i>Brachylaima sensu lato</i> Dujardin, 1843 (Trematoda: Brachylaimidae)	11
1.1.1. Ciclo biológico del género <i>Brachylaima sensu lato</i> Dujardin, 1843.....	11
1.1.2. Morfología de las formas evolutivas de <i>Brachylaima sensu lato</i> Dujardin, 1843.....	11
1.1.3. Análisis morfométricos y adscripción a especies del género <i>Brachylaima sensu lato</i> Dujardin, 1843	13
1.2. <i>Cornu aspersum</i> (= syn. <i>Helix aspersa</i>) Müller, 1774 (Gastropoda: Helicidae)	15
1.2.1. Bionomía de <i>Cornu aspersum</i> Müller, 1774	15
1.2.2. Interés gastronómico de <i>Cornu aspersum</i>	18
1.2.3. Explotaciones helicícolas: estructura y producción.....	19
1.3. La dispersión del género <i>Brachylaima sensu lato</i> Dujardin, 1843 y el posible papel de <i>Cornu aspersum</i> como vector	21
1.4. Riesgo sanitario asociado al binomio <i>Cornu aspersum</i> -Metacercarias <i>Brachylaima sensu lato</i> Dujardin, 1843.....	21
1.4.1. La braquilaimosis.....	21
1.4.2. Hábitos alimentarios y riesgo.....	23
1.5. Tratamiento antihelmíntico veterinario.....	24
1.5.1. Praziquantel	24
1.5.2. Estrategias de administración veterinarias.....	27
1.6. Seguridad alimentaria	27
1.6.1. El residuo de praziquantel permitido en un alimento de consumo humano	27
1.6.2. La técnica de determinación HPLC-MS/MS.....	28
1.7. Efecto del praziquantel en los trematodos	30
1.7.1. Ultraestructura de los trematodos: tegumento y gastrodermis	30

1.7.2. Efecto del praziquantel en la ultraestructura de trematodos	30
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	33
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	37
3.1. Publicación #1: Brachylaimiasis: <i>Brachylaima</i> spp. (Digenea: Brachylaimidae) metacercariae parasitizing the edible snail <i>Cornu aspersum</i> (Helicidae) in Spanish public marketplaces and health associated risk factors.....	41
3.2. Publicación #2: Terrestrial edible land snails as vectors for geographic dissemination of <i>Brachylaima</i> species	61
3.3. Publicación #3: Praziquantel efficacy against <i>Brachylaima</i> sp. metacercariae (trematoda: brachylaimidae) parasitizing the edible landsnail <i>Cornu aspersum</i> and its HPLC-MS/MS residue determination.....	68
3.3.1. Eficacia del praziquantel contra metacercarias <i>Brachylaima</i> spp. parasitando <i>Cornu aspersum</i>	68
3.3.2. Determinación de praziquantel en la matriz biológica <i>Cornu aspersum</i>	71
3.3.3. Determinación en caracoles tratados	74
3.4. Publicación #4: Effect of praziquantel on the tegument and digestive epithelium ultrastructure of <i>Brachylaima</i> sp. metacercariae parasitizing the edible land snail <i>Cornu aspersum</i>	89
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	107
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ABREVIATURAS	134
OTROS MÉRITOS	135

Prefacio

Si a alguien he de agradecer en primer lugar es a la generación de mis abuelos, una generación que luchó para que tuviéramos oportunidades y que defendió el acceso a la educación y a la cultura. Después, he de agradecer a mi familia, quien desde bien pequeña me ha inculcado el gran valor que tenían los estudios y el saber. A mi marido, Joaquín, quien ha aguantado estoicamente mi etapa de investigación pre-doctoral y me ha apoyado en todo momento, la brújula que ha hecho que nunca pierda de vista el Norte. Y, por supuesto, a todos mis amigos, que, aunque son pocos, son de los que nunca te fallan y te acompañan, tanto en los buenos, como en los malos momentos (Raquel, Elena, Aarón, Silvia, Gemma, el Dr. Ribas y el Dr. Calveras).

Pero no es sólo a la familia a quien hay que agradecer, sino a todos los profesores durante mi etapa escolar que siempre creyeron que llegaría muy lejos. Y, por supuesto, a mi directora de tesis la Dra. Mercedes Gracenea quien me dio la oportunidad para cursar el doctorado en su laboratorio y de la que tanto he aprendido, no sólo académicamente sino personalmente. La Dra. Gracenea me ha visto “crecer” desde mi primer año en la universidad. También hay que agradecer a todas las personas que desinteresadamente han contribuido a la consecución de esta tesis doctoral tan multidisciplinar, comenzando por la Dra. Ana Calpena de la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética del Departamento de Tecnología Farmacéutica, quien me aconsejó en mis primeros pasos del desarrollo del método analítico, continuando por el Dr. Isidre Casals, el Dr. David Bellido y el Dr. Alberto Adeba de la Unidad de Espectrometría de Masas CCiT UB por su ayuda en el desarrollo del método analítico en el HPLC-MS/MS. A la Dra. Carmen López, de la Unidad de Microscopía Electrónica CCiT UB por su especial interés en ayudarme a conocer mejor el mundo de la microscopía electrónica mediante los libros (las técnicas de fijación, la ultramicrotomía...), Yolanda Muela y Gema Martínez por su ayuda en el laboratorio de preparación de muestras, al Dr. Jaume Ferrer por acompañarme en mis primeros pasos con el microscopio electrónico de transmisión. Al Dr. Toni Monleon por confirmar que nuestros procedimientos estadísticos y conclusiones de PCA eran correctos y permitirme introducirme en el mundo de “R”, al Dr. Joan Guàrdia por su ayuda en la interpretación del output de los cálculos de regresión logística binaria y multivariante. Y, por último, pero muy importante, agradecer al Dr. Santiago Mas Coma por sus inestimables consejos en el enfoque de los artículos científicos para su publicación.

Dedicatoria

También hay que agradecer a la ANCEC (Asociación Nacional de Cría y Engorde del Caracol) todos sus consejos para el mantenimiento de los gasterópodos en el laboratorio, dejarnos visitar sus granjas y su colaboración y buen hacer cuando lo hemos necesitado.

Resumen

El caracol de consumo humano *Cornu aspersum* Müller, 1774 (Helicidae) actúa como hospedador intermediario en el ciclo biológico del trematodo *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 albergando metacercarias libres en su riñón. La ingestión de caracoles insuficientemente cocinados permitiría a las metacercarias desarrollarse en el intestino humano como adultos causando la braquilaimosis, una parasitosis con una ratio de mortalidad esperada del 5-10%, de la que ya se han descrito casos en Australia. Los objetivos de esta tesis fueron: a) realizar un estudio exploratorio de la prevalencia de metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum* destinados a consumo en mercados españoles; b) estudiar la dinámica de parasitación del caracol considerando la localización geográfica de los caracoles y la estacionalidad como factores de riesgo en cuanto a la exposición de los consumidores al parásito y la posibilidad de contraer una braquilaimosis; c) describir la influencia de la importación de caracoles a España para su comercialización en mercados ya que puede contribuir a la dispersión geográfica de *Brachylaima* spp.; d) evaluar la eficacia del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* spp., estableciendo la dosificación y duración del tratamiento; e) desarrollar un método bioanalítico mediante la técnica HPLC-MS/MS que permita la determinación del praziquantel en la matriz del gasterópodo y f) evaluar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) los cambios de ultraestructura producidos por el praziquantel en metacercarias recuperadas de caracoles tratados.

Un total de 3710 ejemplares de *C. aspersum* fueron analizados durante 5 años en mercados de las ciudades españolas de Barcelona (n=2525), Bilbao (n=207), Madrid (n=290), Tudela (n=301), Valencia (n=163) y Zaragoza (n=224). Se examinó el riñón de cada ejemplar, se identificaron las metacercarias *Brachylaima* spp., y se registró la carga individual de metacercarias de cada espécimen. Se calculó la prevalencia global, la prevalencia estacional, la prevalencia por ciudad y la prevalencia por mercado en el caso de Barcelona (95% de intervalo de confianza). Los factores asociados al riesgo de parasitación humana fueron determinados mediante regresión logística con el objetivo de predecir la probabilidad de adquirir caracoles parasitados utilizando la ciudad y la estación como predictores. La detección de metacercarias *Brachylaima* en caracoles *C. aspersum* procedentes de mercados públicos y destinados a consumo humano, se complementó con el análisis de especímenes importados procedentes de Argelia y Sudáfrica. Se determinó su prevalencia de parasitación por metacercarias *Brachylaima* spp. y se obtuvieron adultos *Brachylaima* experimentales mediante infestaciones experimental de ratones de laboratorio (*Mus musculus* ♀♀ adultos) con las metacercarias procedentes de los caracoles analizados, demostrándose así la viabilidad de las metacercarias, y consiguiéndose una aproximación a su adscripción específica mediante la realización de un análisis morfométrico comparativo con adultos y metacercarias *B. mascomai* y *B. llobregatensis*. Estos adultos experimentales fueron medidos considerando 18 variables para posteriormente realizar estudios morfométricos mediante las herramientas MANOVA y Análisis Componentes Principales y realizar la aproximación de adscripción a *B. mascomai* o *B.*

Resumen

llobregatensis. Para evaluar la eficacia de praziquantel frente metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum* se diseñaron dos ensayos de eficacia según la normativa VICH GL7: el primero de ellos fue de determinación de dosis para encontrar la dosis más adecuada que consiguiera una reducción en la carga parasitaria igual o superior al 90% y el segundo de confirmación de dosis, con la dosis que mejor resultado mostró en el test anterior, en condiciones más similares a las existentes en las explotaciones helicícolas. El praziquantel se administró vía oral a los caracoles mezclándolo con el pienso habitual de engorde. El método analítico HPLC-MS/MS para determinar praziquantel en la matriz de *C. aspersum* se desarrolló siguiendo la guía EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 para métodos bioanalíticos de la Agencia Europea del Medicamento. Los efectos ultraestructurales del praziquantel (PZQ) se evaluaron en metacercarias recuperadas de *Cornu aspersum* tratados individualmente con 1'2 mgPZQ/caracol y 2'4 mgPZQ/caracol o tratados en grupo con la dosis de 2'4 mgPZQ/caracol *ad libitum* durante 7 días, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente mediante microscopía electrónica de rastreo (TEM).

La prevalencia global de metacercarias *Brachylaima* spp. en los especímenes de mercados españoles resultó ser del 41'97% (95% IC: 40'38%-45'56%) con un efecto de estacionalidad, aumentando del verano al otoño. La prevalencia estacional más alta se detectó en otoño (58'65%) y la más baja en invierno (22'64%), la prevalencia fue 46'9% en Barcelona, 30'92% en Bilbao, 6'21% en Madrid, 75'42% en Tudela, 14'72% en Valencia y 17'41% en Zaragoza. En el mercado de Barcelona su máximo fue en otoño, incrementándose de 52'83% en 2009 a 62'23% en 2010 en esta misma estación. El modelo de regresión logística construido para predecir la probabilidad de adquirir caracoles parasitados utilizando la ciudad y la estación como predictores (log likelihood = 1247'501, Cox and Snell square R = 0'362 y Nagelkerke square R = 0'498) consiguió un 79% de acierto global mostrando un efecto de riesgo significativo ($p=0.001$) para la interacción Tudela-Otoño (4.330-78.584) y Barcelona-Otoño (2.551-38.442). Los adultos experimentales obtenidos a partir de metacercarias de *C. aspersum* importados de Argelia ($n=15$) y Sudáfrica ($n=2$) mostraron efectos univariantes en 13 variables ($p \leq 0.001$) y una superposición entre *B. llobregatensis*/Adultos argelinos y *B. mascomai*/Adultos sudafricanos sugiriendo la adscripción a la especie respectivamente. En el ensayo de determinación de dosis se ensayaron tres dosis individualmente (10 días): 1'2 mg PZQ/caracol, 1'8 mg PZQ/caracol (eficacia 97'3 %, $p<0.001$) y 2'4 mg PZQ/caracol (eficacia 98'7%, $p<0.001$). En el test de confirmación de dosis ($n=200$) la dosis de 2'4 mg/caracol se ensayó en grupo (10 caracoles/caja, 7 días): diariamente se dispusieron 2 g de comida de caracol suplementada con praziquantel en las cajas del grupo de tratamiento y 2 g de comida de caracol (placebo) en las cajas del grupo control (eficacia 94'6 %, $p<0.001$; la prevalencia disminuyó del 68'7 % en el grupo control al 10'1 % en el grupo tratamiento, $p<0.001$). La dosis recibida correspondió a 200'2 mg PZQ/kg de caracol con concha. En el método analítico se evaluó la linealidad, en rango 0'05-0'8 $\mu\text{g/ml}$ (bajas concentraciones) y 0'8-6 $\mu\text{g/ml}$ (altas concentraciones) siendo ambas rectas evaluadas por triplicado y obteniéndose los ajustes $r^2=0'999$, $r^2=0'999$, $r^2=0'999$, y. $r^2=0'996$, $r^2=0'997$, $r^2=0'999$, respectivamente; se determinó el límite de cuantificación

inferior siendo 0'05 µg/ml, la selectividad donde los blancos no superaron el 20% del área obtenida para el estándar del LLOQ (0'05 µg/ml), el efecto de arrastre en que la inyección de muestras concentradas (6 µg/ml, ULOQ) seguida de blancos no superó el 20% de la señal del LLOQ, la exactitud consiguiéndose variaciones nominales inferiores al ±20%, la precisión manteniéndose en el intervalo de 15-20%, la integridad de la dilución donde los controles de 0'8 µgPZQ/ml (dilución 1:10) mantuvo los límites establecidos para exactitud y la precisión; el efecto matriz para los controles de concentración 0'08 y 5'0 µgPZQ/ml resultó ser %CV = 10'86 y %CV = 10'01, respectivamente, y la estabilidad se mantuvo dentro del ±15% del valor nominal para 24h a temperatura ambiente, 24h, 1 mes y 3 meses congelador/descongelación a temperatura ambiente. Se determinó cuantitativamente el residuo de praziquantel (n=60) en caracoles tratados (11 mgPZQ/g pienso), siendo de 0'093 mgPZQ/g caracol (10% del PZQ teóricamente ingerido) para poder detectar límites fuera de la ingesta diaria permitida de praziquantel por la EMA (10mg/persona). Los estudios TEM mostraron que los cuerpos celulares tegumentarios T2 pierden su orientación característica no mostrándose perpendiculares a la superficie externa del tegumento, así como las mitocondrias que dejaron de presentarse en la zona basal para distribuirse por todo el tegumento y mostrarse alteradas. El contenido normal altamente electrodenso de los cuerpos celulares tegumentarios T2 aparece degenerado originando un contenido poco denso a los electrones y mostrando acúmulos electrodensos repartidos alrededor de la periferia de la vesícula y separados por espacios claros, poco densos. Este tipo de alteraciones en cuanto al contenido se detectó a nivel de las células tegumentarias sugiriendo que la alteración comenzaría en el nivel de producción de estas inclusiones tegumentarias. La contracción producida en el sistema digestivo fue tan severa que el lumen no pudo apreciarse.

Preámbulo

Esta tesis se presenta como compendio de publicaciones. En el Capítulo 1 se realiza una introducción general para situar al lector y presentar el marco que englobará cada uno de los trabajos presentados en el Capítulo 3. En el Capítulo 2 se definen los objetivos de esta tesis y en el Capítulo 3 se presentan los resultados de la investigación realizada en cuatro secciones, una para cada trabajo, con un resumen global al comienzo de cada sección. En el Capítulo 4 se realiza una discusión global de todos los trabajos y en el Capítulo 5 se recogen las conclusiones principales.

CAPÍTULO 1: Introducción

1.1. El género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 (Trematoda: Brachylaimidae)

El género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 pertenece a la familia Brachylaimidae, Joyeux et Foley, 1930 incluida en la superfamilia Brachylaimoidea. Las relaciones filogenéticas resultan complejas en esta superfamilia y las establecidas obedecen más a criterios morfológicos y de ciclos biológicos, que a otros criterios como el análisis de ADN (Heneberg y cols., 2016). Valero (1986) verificó la correcta inclusión de Brachylaimidae como unidad con independencia taxonómica familiar y presentó una nueva propuesta sistemática basada en caracteres morfoanatómicos, bioecológicos y geográficos. Concretamente, el género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 es un género ampliamente distribuido a nivel global y, afortunadamente, uno de los géneros mejor estudiados de la superfamilia Brachylaimoidea y el único, del que se tenga conocimiento, con capacidad para parasitar al hombre (Butcher y cols., 1996, 1998; Butcher y Grove, 2001; Gracenea y González-Moreno, 2002; Heneberg y cols., 2016).

1.1.1. Ciclo biológico del género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843

El ciclo biológico de *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 es un ciclo triheteroxeno terrestre (Figura 1) que implica la participación de moluscos gasterópodos pulmonados terrestres, actuando como primeros y segundos hospedadores intermediarios albergantes de las formas larvarias de esporocisto, cercaria y metacercaria, y de un hospedador definitivo albergante del estadio adulto (Mas-Coma y Gállego, 1975; Yamaguti, 1975; González-Moreno y cols., 1994; Gracenea y González-Moreno, 2002).

1.1.2. Morfología de las formas evolutivas de *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843

En el presente apartado se describen las formas evolutivas de *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 que intervienen en el ciclo biológico descrito en el apartado anterior (1.1.1.).

Huevos: operculados, ovalados de color amarillo-marrón con un tamaño de 25-30 μm (Mas-Coma y Gállego, 1975; Yamaguti, 1975; Cribb, 1990;).

Esporocistos: cercariógenos ramificados provistos de poros de salida en los extremos (Mas-Coma y Gállego, 1975; Yamaguti, 1975; Pojmańska, 2002a, b).

Cercarias: microcercas sin estilete anterior y ovales; tegumento liso o espinulado; ventosa oral terminal o subterminal localizándose en ella la boca; ventosa ventral ecuatorial; faringe desarrollada; ciegos intestinales hasta el nivel de ventosa ventral o excediéndola. (Mas-Coma y Gállego, 1975; Yamaguti, 1975; Pojmańska, 2002a, b).

Introducción

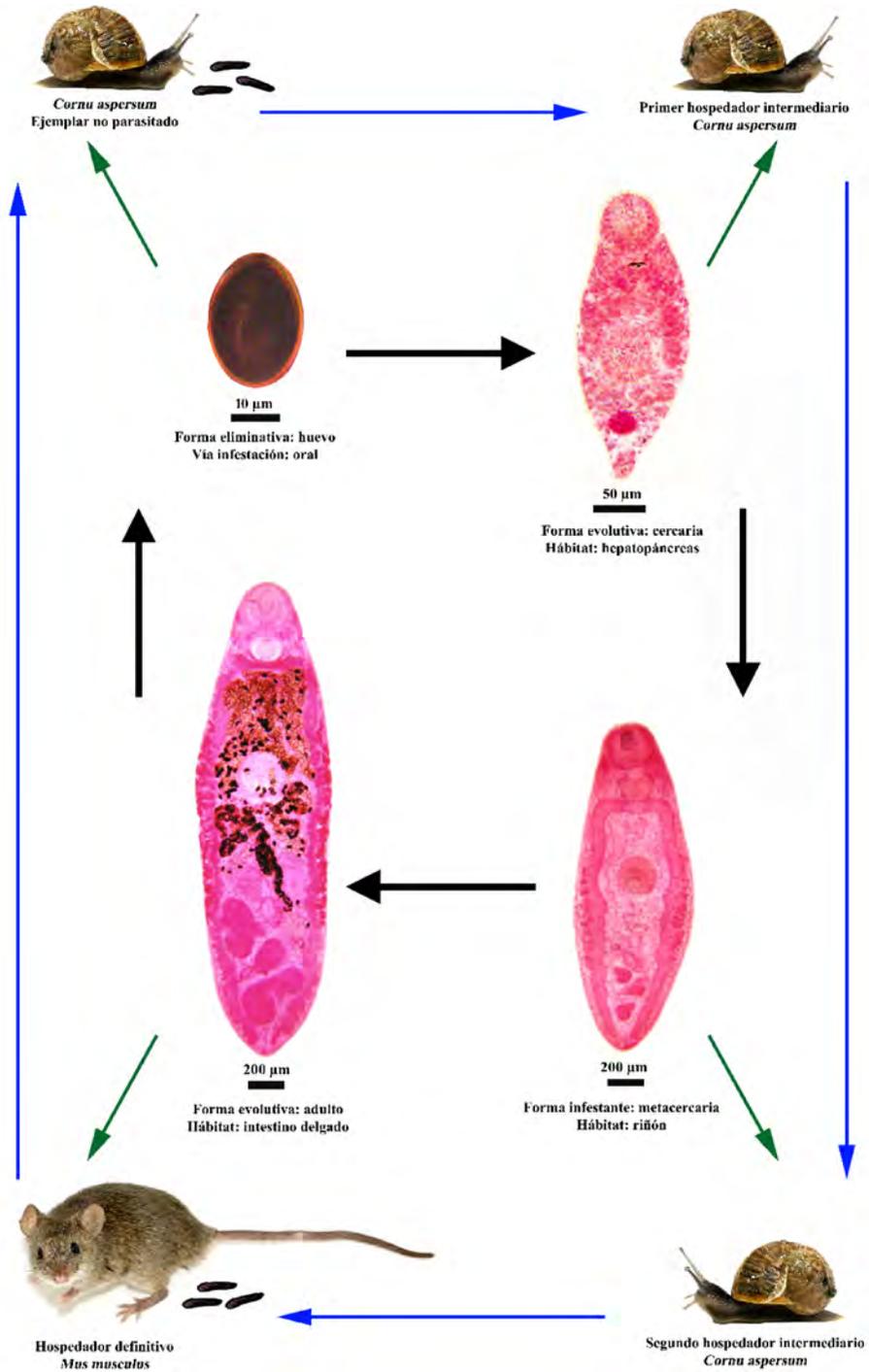


Figura 1. Ciclo biológico de *Brachylaima* sp. Fotografías de *Brachylaima* sp. adulto, metacercaria, cercaria y huevo (Laia Gállego). Fotografía *Cornu aspersum* (Laia Gállego). Fotografía de *Mus musculus* (George Shuklin, free common vía Wikipedia).

Metacercarias: libres, sin enquistar y ovals (Figura 2); tegumento liso o espinulado, poro excretor terminal; ventosa oral terminal o subterminal en cuyo fondo se localiza la boca; ventosa ventral ecuatorial o en el tercio posterior del cuerpo; faringe desarrollada; ciegos intestinales largos alcanzando el extremo del cuerpo; poro genital ventral; testículos y ovario dispuestos postacetabularmente y situándose el ovario entre los testículos; glándulas vitelógenas en posición lateral con extensión variable y no siempre visibles (Mas-Coma y Gállego, 1975; Yamaguti, 1975; Pojmańska, 2002a, b).

Figura 2. Metacercaria *Brachylaima* sp. (izquierda) Ciego (C), Faringe (F), Glándulas Vitelógenas (Vi), Ovario (Ov), Poro Genital (Pg), Ventosa Oral (VO), Ventosa Ventral (VV), Testículo 1 (Te1), Testículo 2 (Te2) (Fotografía: Laia Gállego).

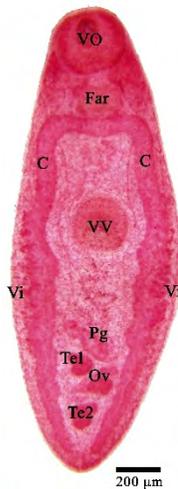
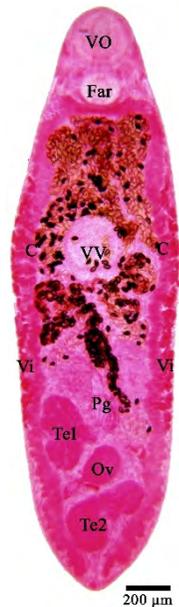


Figura 3. Adulto *Brachylaima* sp. (derecha) Ciego (C), Faringe (F), Glándulas Vitelógenas (Vi), Huevos (H), Ovario (Ov), Poro Genital (Pg), Ventosa Oral (VO), Ventosa Ventral (VV), Testículo 1 (Te1), Testículo 2 (Te2) (Fotografía: Laia Gállego).



Adultos: con morfología variable (Figura 3), desde ovalados casi redondeados hasta finos y adelgazados; tegumento liso o espinulado; ventosa oral terminal o subterminal, ventosa ventral con localización variable; faringe desarrollada; ciegos intestinales largos alcanzando el extremo del cuerpo; poro genital ventral siempre postacetabular; testículos y ovario subsféricos u ovalados postacetabulares y situándose el ovario entre los dos testículos; El útero asciende hacia la zona anterior del verme, cuyo interior se encuentra lleno de huevos. (Yamaguti, 1971; Mas-Coma y Gállego, 1975; Yamaguti, 1975; Pojmańska, 2002a, b).

1.1.3. Análisis morfométricos y adscripción a especies del género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la adscripción de las metacercarias *Brachylaima* a una especie requiere la obtención de los adultos. Wootton y Murrell (1967),

Introducción

Pojmanska (1972) y Mas-Coma y Gállego (1975), autores que han trabajado en profundidad con el género *Brachylaima* y la familia Brachylaimidae, coinciden en sugerir que el conocimiento del ciclo biológico completo es esencial cuando se trata de establecer de forma precisa nuevos taxones. Ahora bien, el ciclo biológico es complejo, triheteroxeno, y la dificultad de su realización experimental es evidente. En este sentido, las medidas morfométricas resultan ser herramientas útiles para aproximar adultos *Brachylaima* a taxones específicos, si bien esto sólo aplica cuando los adultos que se comparan tienen edad equivalente (Cribb, 1990).

Mas-Coma y cols. (1984) estandarizaron el procedimiento de obtención de las medidas morfométricas en la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley con el objetivo de conseguir unificar la metodología de estudio y aportar una solución al problema de la variabilidad intraespecífica, siendo de especial aplicabilidad al género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 ya que las especies de este género pueden ser indiferenciables a nivel de adulto (Figura 4). La importancia de la estandarización de las mediciones se incrementa al permitir la ulterior aplicación de herramientas estadísticas que consiguen optimizar la diferenciación entre especies. En este sentido, la caracterización fenotípica de poblaciones de *Fasciola*, fundamentalmente *F. hepatica* y *F. gigantica*, ha permitido su diferenciación, mediante morfometría, en zonas geográficas donde son coincidentes y la determinación de formas intermedias (Valero y cols., 2001, Ashrafi y cols., 2006; Periago y cols., 2006; Mas-Coma y cols., 2009; Ashrafi y cols., 2015). Asimismo, la aplicación de sistemas computerizados de análisis de imágenes optimiza los resultados obtenidos (Moghaddam y cols., 2004; Periago y cols., 2008; Valero y cols., 2009; Valero y cols., 2012; Afshan y cols., 2014; Ahasan y cols., 2016).

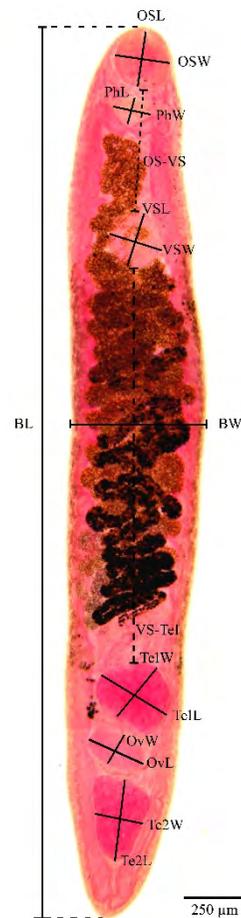


Figura 4. Medidas según la metodología establecida por Mas-Coma y cols. (1984) en un *Brachylaima* sp. adulto. (Fotografía: Laia Gállego).

Longitud Corporal (BL), Anchura Corporal (BW), Longitud Ventosa Oral (OSL), Anchura Ventosa Oral (OSW), Longitud Faringe (PhL), Anchura Faringe (PhW), Longitud Ventosa Ventral (VSL), Anchura Ventosa Ventral (VSW), Longitud Testículo 1 (Te1L), Anchura Testículo 1 (Te1W), Longitud Ovario (OvL), Anchura Ovario (OvW), Longitud Testículo 2 (Te2L), Anchura Testículo 2 (Te2W), Distancia entre la Ventosa Oral y la Ventosa Ventral (OS-VS), and Distancia entre la Ventosa Ventral y la el Testículo 1 (VS-Te1).

La aplicación de métodos estadísticos multivariantes (Rohlf y Marcus, 1993) permite, mediante el análisis de componentes principales, resumir la mayor parte de la variación que ocurre en los sets de datos en un mínimo de dimensiones, siendo así el primer componente principal (PC1) la combinación lineal que explica la máxima varianza (Klingenberg, 1996) y, mediante el análisis discriminante, crear un modelo predictivo para la pertenencia al grupo compuesto por una o más funciones discriminantes basadas en combinaciones lineales de las variables predictoras.

El análisis discriminante canónico ha sido utilizado por Valero y cols. (2012) para evidenciar y evaluar diferencias morfométricas entre *Fasciola hepatica* de diferentes áreas geográficas (Cajamarca, Perú; Mantaro, Perú; N Altiplano, Bolivia; Valencia, España; y Bialoweza, Polonia). El Análisis de Componentes Principales (ACP, PCA siglas en inglés) ha sido empleado por Hahn y cols. (2011) para re-describir la morfometría y diferencias entre *Gyrodactylus teuchis* de *Gyrodactylus salaris* (patógeno). Asimismo, Hanelt y Janovy Jr. (2002) utilizaron PCA para distinguir, mediante morfometría, los estadios no adultos de *Gordius robustus*, *Paragordius varius* y *Chordodes morgani*.

En el caso de *Brachylaima* sp., González-Moreno (2002) primeramente comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas entre distintas variables morfométricas aplicando el Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA) para, posteriormente, realizar un análisis discriminante multivariante en distintas poblaciones de *Brachylaima* spp. incluyendo especímenes identificados como *B. mascomai* y otros sin adscribir a ninguna especie. González-Moreno (2002) obtuvo la separación de dos grupos, uno correspondiente a *B. mascomai* y otro a la especie que terminaría siendo *B. llobregatensis*, tras cerrar el ciclo biológico (González-Moreno y Gracenea, 2006), y que junto *B. aspersae* (Segade y cols., 2011) son las especies *Brachylaima* descritas en España que parasitan a *C. aspersum* destinados a consumo humano.

1.2. *Cornu aspersum* (= syn. *Helix aspersa*) Müller, 1774 (Gastropoda: Helicidae)

1.2.1. Bionomía de *Cornu aspersum* Müller, 1774

Identificación: *C. aspersum* (Figura 5) es un gasterópodo que presenta un caparazón globoso-cónico, de tamaño grande y con la espira elevada, sólida y opaca. Aunque es amplio el polimorfismo en lo que concierne a la coloración del caparazón, suele ir de terroso claro y terroso amarillo al terroso grisáceo, con flámulas oscuras variables más claras de fondo. Presenta hasta 5

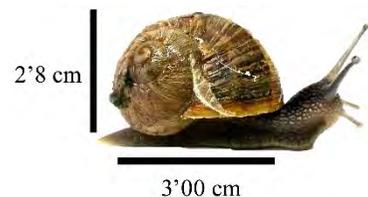


Figura 5. *Cornu aspersum* adulto procedente de un mercado de abasto. (Laia Gállego)

Introducción

vueltas de espiral muy convexas. Los especímenes adultos adquieren una altura que oscila entre 25 y 35 mm estando su diámetro máximo comprendido entre 28 y 45 mm (Chevallier, 1986; Bech, 1990). Han sido descritos diversos morfotipos de *Cornu aspersum* debido a su variabilidad morfológica. La forma *maxima* ha sido considerada como una subespecie, *Cornu aspersum maxima* (Taylor, 1883), que puede localizarse principalmente en el norte de África (Cadevall y Orozco, 2016), si bien su estatus taxonómico no está totalmente consensuado (Guiller y cols., 2001). Consecuentemente, el presente trabajo se referirá a la “subespecie” *Cornu aspersum aspersum* (Müller, 1774) a la que se denominará *Cornu aspersum*. Su árbol taxonómico se define como sigue:

Phylum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Subclase: Pulmonata

Orden: Stylommatophora

Suborden: Sigmurethra

Superfamilia: Helicoidea

Familia: Helicidae Rafinesque, 1815

Género: *Cornu* Born, 1778

Especie: *Cornu aspersum* (Müller, 1774)

Hábitat: se trata de una especie higrófila y sinantrópica, vive en cualquier tipo de ambiente, sobre todo en jardines y bordes de cultivos. Encuentra refugio bajo piedras, maderas, plásticos o cartones (Cadevall y Orozco, 2016). *C. aspersum* puede encontrarse en diversos hábitats y climas, desde climas mediterráneos a climas templados, oceánicos y tropicales (Chevallier, 1977). *C. aspersum* precisa de temperaturas entre 7 y 28°C y una elevada humedad (75-90%) para mostrarse activo (Daguzan, 1980). Si las condiciones son desfavorables, puede permanecer hibernando durante varios meses (Ansart y cols., 2002). Prefiere microhábitats con mucha intensidad de luz y con refugios que le permitan hibernar si es preciso, así como guarecerse de posibles depredadores (Perea y cols., 2007).

Distribución: Su origen se sitúa, probablemente, en el norte de África (Taylor, 1914). Su análisis filogenético molecular evidencia su diferenciación en dos linajes denominados este y oeste, habiéndose expandido este último desde el norte de África hacia Europa en función de los sucesos geológicos ocurridos en la zona, que, adicionalmente, favorecieron el asilamiento entre ambas poblaciones (Guiller y cols., 2001). Sin embargo, parecen haberse producido contactos secundarios, atribuibles a factores geológicos e incluso antropogénicos, entre ambas poblaciones que explicarían la detección de formas intermedias en algunas

zonas como el noroeste de España y Francia, e incluso en áreas muy concretas del norte de África (Guiller y Madec, 2010).

Su dispersión geográfica ha resultado explosiva, estando presente actualmente en América del Norte y del Sur, África, Asia y Oceanía. Ahora bien, cabe diferenciar entre un origen nativo del caracol y un origen introducido, ya que, principalmente, la dispersión global se ha producido de forma antropogénica, bien por su uso alimentario o accidentalmente (Ansart y cols., 2009; Guiller y cols., 2012).

La especie es nativa en Marruecos, Argelia y Túnez en lo que respecta al continente africano y en Portugal, Gibraltar, España, Baleares, Andorra, Francia, Córcega, Cerdeña, Italia, Sicilia, Malta, Grecia y Chipre en lo que respecta al continente europeo, regiones situadas en la cuenca mediterránea. En nuestro entorno próximo, el gasterópodo se extiende por toda la Península Ibérica, excepto en el sureste más árido en Almería (Cadevall y Orozco, 2016).

La especie se considera introducida en las Islas Canarias, Isla Santa Elena, Sudáfrica, Lesoto, Zimbabue, Isla Reunión, Isla Mauricio y las Seychelles en el continente africano y en Luxemburgo, Bélgica, Países Bajos, Reino Unido, Irlanda, Dinamarca, Alemania, Liechtenstein, Suiza, Austria, República Checa, Hungría, Rumanía Croacia, Bosnia y Herzegovina, Albania, Malta, Polonia, Estonia, Suecia, Noruega, Ucrania y Rusia, en el continente europeo. Ha sido introducido el gasterópodo en Turquía, durante la colonización Romana, y, posteriormente, en Siria, Líbano, Israel, Arabia Saudí, Tailandia y Filipinas. Asimismo, en Australia, Nueva Zelanda, la Isla de Norfolk, Nueva Caledonia, las Islas Fiyi, Niue, Samoa, la Polinesia Francesa y la Isla de Pitcairn. En el continente americano, *C. aspersum* fue introducido durante las colonizaciones españolas del siglo XIV, en Haití y Chile, y, posteriormente en Argentina, Uruguay, Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, la Guayana, la Guayana Francesa, Martinica, México, en 19 estados de Estados Unidos de América y en Canadá. La implantación de granjas de heliocultura ha favorecido su presencia en Bielorrusia, Bulgaria, Eslovaquia, Eslovenia y Macedonia (Ansart y cols., 2009).

Introducción

1.2.2. Interés gastronómico de *Cornu aspersum*



Figura 6. Caracoles *Iberus alonensis* encontrados en el yacimiento Cova de la Barriada en Valencia con rastros de haber sido quemados (Fotografía: Fernández-López de Pablo y cols., 2014; Modificada Creative Common License, vía Plos ONE).

Cornu aspersum es un caracol de interés culinario. En Europa el consumo de caracoles es una tradición y se tiene constancia del consumo habitual de caracoles desde la prehistoria. Recientemente han sido encontrados (Figura 6) como restos de comida en asentamientos arqueológicos de Valencia (Lubell, 2004; Fernández-López de Pablo y cols., 2014).

Los datos estimativos de que se disponen tienen su fuente en estudios de mercado, e indican un consumo de caracoles anual de 400 gr /persona/año en nuestro país, lo que supondría unos 16 millones de kilogramos anuales. El origen mayoritario de este animal es silvestre, suponiendo el caracol de crianza apenas el 3% del total comercializado (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2016). En la actualidad la recogida masiva está regulada por la Ley 42/2007 de Patrimonio Natural y Biodiversidad. En la Comunidad Valenciana, el decreto 21/2012 del Consell de la Generalitat Valenciana (Diari Oficial de la Generalitat Valenciana, 2012) establece el límite en un kilogramo por persona y día, todo ello con el objetivo de reducir la recogida únicamente para autoconsumo ya que la venta de caracol silvestre está totalmente prohibida. En España hay más de cien explotaciones helicícolas en estado de alta.

La península Ibérica se configura como el área geográfica con mayor importancia de consumo (Figura 7) y comercialización de *C. aspersum* (RuralCat, 2010), aunque su



Figura 7. Caracoles a la Llauna dels Trulls, Lleida (Fotografía: Domènec Leal, free common dominio público, vía Wikipedia).

consumo es internacional siendo España (11.636.006 kg), Francia (2.793.846 kg), Portugal (1.896.886 kg), Grecia (1.435.169 kg), Bosnia Herzegovina (1.067.479 kg), Rumania (956.272 kg), República Checa (839.391 kg), Italia (807.872 kg), Turquía (674.197 kg), Hungría (387.782 kg), Malaysia (338.737 kg), Lituania (278.841 kg), Hong Kong (276.153 kg), China (258.269 kg) y Serbia (241.844 kg), entre otros, los países que más kilogramos

caracoles importaron según datos obtenidos de la base de datos COMTRADE correspondientes a 2015 de las Naciones Unidas (Naciones Unidas, 2016).

1.2.3. Explotaciones helicícolas: estructura y producción

Los ensayos de eficacia del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 llevados a cabo (publicación #3) han sido diseñados con el objetivo último de ser aplicados en explotaciones helicícolas. Con esta finalidad, se empleó una metodología de laboratorio transferible fácilmente a dichas explotaciones y adaptada al manejo habitual de los gasterópodos en ellas. El sector helicícola, al igual que el resto de sectores agrícolas y ganaderos, se encuentra recogido dentro del régimen de la Organización Común de Mercados agrícolas creada y regulada por el Reglamento (CE) 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de 2007 (Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones territoriales, 2007), el cual establece disposiciones específicas para determinados productos agrícolas. Dentro del ámbito jurídico nacional, las explotaciones helicícolas se encuentran reguladas como actividad ganadera por la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal, que establece las normas básicas y de coordinación en materia de sanidad animal para todas las explotaciones ganaderas y regula la sanidad exterior en lo relativo a la sanidad animal

(Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones territoriales, 2003). Se despliega en los Reales Decretos 479/2004 y 1144/2006 que regulan el registro de las explotaciones ganaderas y la higiene de los piensos (Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones territoriales, 2004, 2006). En el ámbito comunitario son de cumplimiento los Reglamentos (CE) 178/2002, (CE) 1774/2004, (CE) (CE) 852/2004, (CE) 853/2004,



Figura 8. Granja de helicicultura del nordeste de España. Detalle de los carriles con vegetación en su interior y soportes metálicos con lonas cuadradas negras. (Fotografía: Laia Gállego).



Figura 9. Granja de helicicultura del nordeste de España. Detalle de los carriles y del aspersor para controlar la humedad (Fotografía: Laia Gállego).

Introducción

(CE) 183/2005 y (CE) N° 1234/2007 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002, 2004a, b, c, 2005, 2007) relativos a la higiene de los productos alimenticios, a las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, a las normas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados a consumo humano y a los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria. El conjunto normativo establece que el caracol es un alimento, que los establecimientos que los producen vivos son

empresas alimentarias y que la producción, cría o cultivo y crecimiento o recolección en las explotaciones y su posible transporte son actividades del ámbito de la producción primaria. Los caracoles son considerados producto primario tanto para su venta como para su transformación. Ya en 2013 (Orden AAA/334/2013), son definidas las explotaciones helicícolas, como las instalaciones dedicadas a la producción de *C. aspersum* para su engorde y consumo humano, a efectos de su seguro de producción (Ministerio de Agricultura,



Figura 10. Detalle de las lonas de descanso para los caracoles y el sistema de alimentación. (Fotografía: Laia Gállego, derechos ElSevier©).

Alimentación y Medio Ambiente, 2013). Estas explotaciones helicícolas pueden estar destinadas a la cría de caracoles o bien a su engorde, siendo menos frecuentes las que llevan a cabo ambas tareas. Las explotaciones de engorde son las más abundantes en nuestro entorno geográfico, siendo más de cien las registradas. Pueden tener un carácter intensivo, tratándose de instalaciones cerradas en las que los factores ambientales (luz, humedad, temperatura) están totalmente controlados, o extensivo, cuando las instalaciones son a cielo abierto, si bien están valladas y protegidas frente a roedores y aves. En ellas, la humedad puede ser parcialmente controlada mediante aspersores y la insolación mediante mallas. Las explotaciones de engorde extensivas son las más abundantes en nuestro entorno geográfico y los ensayos de tratamiento antihelmíntico de los caracoles se han diseñado teniendo en cuenta su aplicación futura a este tipo de instalaciones. Se trata de recintos vallados perimetralmente y divididos en carriles longitudinales de una anchura aproximada de 1 m en los que se disponen los caracoles, separados por pasillos que permiten el tránsito de las personas encargadas de la explotación. Los carriles están provistos de cobertura vegetal que procura a los caracoles cobijo y alimento adicional y en ellos se disponen soportes metálicos de los que penden lonas cuadradas de forma vertical en las que se refugian los caracoles. Estos soportes metálicos están provistos de un sistema de alimentación que consiste en una

bandeja metálica (40cm x 10cm) sobre la que se deposita el pienso que constituye el alimento principal de los caracoles (Figuras 8, 9, 10) (Chevallier, 1986). Las instalaciones, los materiales y el correcto manejo de los animales son descritos en las Guías de Prácticas correctas de Higiene Helicicultura, editadas por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2009).

Una granja de helicicultura que sólo dispusiera de 100 m² podría albergar alrededor de 17000 caracoles adultos (Chevallier, 1986). La máxima densidad de *C. aspersum* adultos correspondería a 170 caracoles/m² para así poder rentabilizar al máximo las instalaciones. Si se trata de caracoles que están siendo engordados, esta densidad correspondería a 300 caracoles/m² para los de 5 g y de 750 caracoles/m² para los de 2g (Figuras 8, 9, 10).

1.3. La dispersión del género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 y el posible papel de *Cornu aspersum* como vector

Las metacercarias de *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 son de carácter cosmopolita. Esto se debe, en primer lugar, a su poca especificidad respecto el segundo hospedador intermediario ya que la parasitación por metacercarias *Brachylaima* sp. se ha descrito en diversas especies de gasterópodo (Mas-Coma y Montoliu, 1986; Gracenea y González Moreno, 2002; González-Moreno y Gracenea, 2006). Y, en segundo lugar, a la dispersión global del vector *C. aspersum*, tal y como se ha explicado en el apartado 1.2.1, ahora presente en muchas zonas de clima Mediterráneo, temperado o incluso sub-tropical, en el continente Americano y Africano, así como en las Islas Mascareñas, Oceanía y Asia (Ansart y cols., 2009), y aún más se acentúa si se tienen en cuenta los flujos internacionales comerciales de *C. aspersum* (Naciones Unidas, 2016).

1.4. Riesgo sanitario asociado al binomio *Cornu aspersum*-Metacercarias *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843

1.4.1. La braquilaimosis

La ingestión de caracoles parasitados por metacercarias *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843, crudos o insuficientemente cocinados, puede conducir a la parasitación humana y ocasionar la trematodosis intestinal conocida como braquilaimosis. Esta parasitosis presenta una sintomatología inespecífica que se traduce fundamentalmente en diarrea (100%), dolor abdominal (58%) y pérdida o poca ganancia de peso (58%) debido a la naturaleza hematófaga de los adultos intestinales de *Brachylaima* spp. (Butcher, 2006). Puede alcanzar una tasa de mortalidad que oscila entre el 5% y el 10% en ausencia de tratamiento (Meerburg y cols., 2009).

Introducción

Los dos primeros casos diagnosticados de esta trematodosis fueron pediátricos (Butcher y cols., 1996) y se localizaron en una zona rural del sur de Australia. La especie implicada fue denominada *B. cribbi* y en su ciclo biológico interviene el helícido terrestre *Theba pisana* como primer hospedador intermediario y los también helícidos terrestres *Cerneuella virgata* y *C. aspersum* como segundos hospedadores intermediarios (Butcher y Grove, 2001). Es el primer brachyláimido causante de parasitación humana y su origen se postula europeo, ya que ésta es la procedencia de sus hospedadores intermediarios, caracoles terrestres introducidos en Australia desde Europa (Cribb, 1990). El carácter mediterráneo del área australiana donde se produjo la infestación favorece el desarrollo de los helícidos terrestres que llegan a constituir verdaderas plagas en aquellos biotopos (Hopkins y Baker, 1993), hecho que incrementa el acceso humano.

La braquilaimosis puede presentar complicaciones médicas, más allá de la sintomatología mencionada, puesto que, en algunas infecciones por trematodos, los huevos alcanzan, vía sistémica, otros tejidos como el tejido cardíaco produciendo lesiones patológicas (Africa y cols., 1935). Así puede ocurrir en las heterofidiosis. El pequeño tamaño de los huevos de heterófidos favorece su dispersión vía sanguínea desde el hábitat intestinal hasta el miocardio, originando una miocarditis (Belizario y cols., 2001). El 14'9% de los casos de fallo cardíaco en Filipinas parecen tener este origen (Kean y Breslau, 1964). El carácter hematófago de los adultos *Brachylaima* hace que éstos se introduzcan profundamente en la mucosa intestinal hasta llegar a un vaso sanguíneo a través del cual bien pueden los huevos, que tienen un tamaño inferior incluso a los de heterófidos, llegar a tejidos extra-intestinales, como es el caso del miocardio. Esta posibilidad coincide con dos de los casos humanos de braquilaimosis diagnosticados en niños australianos, los cuales presentaron alteraciones cardíacas en los que la infección por el trematodo vía sistémica no puede ser totalmente descartada (Butcher y cols., 1996). En Australia, se han llegado a diagnosticar hasta 13 casos de braquilaimosis (Butcher y cols., 1996, 1998; Butcher and Groove, 2001; Butcher, 2006; Butcher, 2016), siendo accidental u oportunista la ingestión de los caracoles (Spratt, 2005). Hay que tener presente que, en otras áreas geográficas como la europea, la ingestión de caracoles no es accidental sino habitual, y forma parte de los hábitos gastronómicos de la población humana.

Cabe destacar la dificultad del diagnóstico de la braquilaimosis, asociada a la inespecificidad de la sintomatología clínica y al pequeño tamaño de los huevos de *Brachylaima* spp. (25-30 µm longitud) (Figura 1) que dificulta su detección en heces, lo que hace posible que muchos casos de braquilaimosis resulten, muy probablemente, infradiagnosticados (Cribb, 1990;

Butcher y cols., 1996; 1998, 2002; Gracenea y González Moreno, 2002; González-Moreno y Gracenea, 2006).

Desde el punto de vista epidemiológico, la braquilaimosis presenta reservorios muy diversos que incrementan su dispersión geográfica. Algunos de estos reservorios son vertebrados próximos al hombre, siendo esta proximidad un factor favorecedor del contacto con el mismo. Entre ellos se encuentran los roedores, hospedadores definitivos del parásito (Mas-Coma y Montoliu, 1986; Gracenea y González-Moreno, 2002; González-Moreno y Gracenea, 2006; Segade y cols., 2011) que colaboran activamente en su dispersión, dado que están implicados en el ciclo del parásito. Consecuentemente, pueden favorecer la aparición de focos de la parasitosis en la población humana próxima a estos vertebrados.

1.4.2. Hábitos alimentarios y riesgo

En 2009 en España se consumieron 10942 toneladas de caracoles; en 2010, Francia consumió 22000 toneladas, e Italia consumió 38000 toneladas, datos que están en consonancia con los mencionados anteriormente (1.2.2). En general, el consumo mundial de caracoles se estima en unas 450000 toneladas/año (RuralCat, 2010; ProChile, 2011; Istituto Internazionale di Elicicoltura Cherasco, 2015). En algunos países como Australia, la ingestión de caracoles es accidental, pero en Europa se trata de una tradición culinaria, tal y como se ha comentado previamente (1.2.2). En consecuencia, si la ingestión de caracoles no es accidental, sino habitual, el riesgo de parasitación humana y de contraer una braquilaimosis es mayor, ya que los caracoles destinados a consumo humano en los mercados públicos presentan parasitaciones muy elevadas, llegando a una prevalencia del 94'57%, y continuadas, tal y como se recoge en la publicación #1 del presente trabajo. Además, se han detectado prevalencias de parasitación por metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum* de hasta el 97% en explotaciones helicícolas (Gracenea y cols., 2009; Segade y cols., 2011).

La exposición media al parásito puede aproximarse teniendo en cuenta que el consumo medio admitido en nuestro país es de 400 gr de caracoles/persona/año. Esto implica la ingestión de 50 ejemplares (8g/ejemplar). Considerando que la parasitación media por metacercarias *Brachylaima* spp. es 41'97% (CI 40'38%-45'56%), el número de caracoles parasitados será 21 (CI 20-23), para el consumo indicado, según se desprende de los datos aportados en la publicación #1. Asimismo, si se parte de los datos de parasitación media máxima obtenidos en un mercado, ésta es de 75,42% (CI 70,55%-80,28%), lo cual supone 38 caracoles parasitados en una ingesta de 50 ejemplares (CI 35-40). Consecuentemente, la probabilidad de ingerir uno o varios ejemplares parasitados es considerablemente elevada.

Introducción

Únicamente la práctica culinaria de someter este alimento a una cocción adecuada reduce la posibilidad de parasitación. El parásito está presente en el alimento y éste es ingerido por la población, existiendo, así, un riesgo asociado a su consumo.

La mayor parte de los países consumidores de caracoles son también importadores, dado que su capacidad productiva no consigue satisfacer la demanda de su mercado interno. Esta situación conlleva una intensa circulación del parásito siguiendo las vías de distribución internacional de alimentos, asociada a una evidente falta de trazabilidad en el caso de los caracoles terrestres, ya que no existen normas específicas de seguridad alimentaria referentes a gasterópodos terrestres, estando únicamente sujetos de manera general a la normativa ganadera. Resulta de interés destacar que la detección de patógenos en productos alimentarios finales está siendo sustituida por el sistema de análisis de riesgo en puntos críticos (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) que incluye, de forma muy razonable, la implementación de acciones para prevenir la contaminación de los productos alimenticios a lo largo del proceso de producción (Robertson y cols., 2014). Puede resultar interesante la aplicación del sistema HACCP a la producción de caracoles en las explotaciones helicícolas, dado que el elevado número de ejemplares que en ellas se producen dificulta notablemente el control del producto final, en lo referente a la parasitación por metacercarias, pero hace posible la implementación de medidas preventivas eficaces para impedir la introducción del parásito.

En este escenario de mercados globalizados, se detecta un incremento progresivo de las parasitosis de origen alimentario, llegando a 107 las especies parásitas asociadas a esta vía de transmisión (Orlandi y cols., 2002).

Cabe destacar Spratt (2005), Fitzpatrick (2013) y Robertson y cols. (2014) son autores que han remarcado la importancia de la seguridad alimentaria y la emergencia de las enfermedades transmitidas por alimentos debido a la globalización.

1.5. Tratamiento antihelmíntico veterinario

En este contexto, el tratamiento farmacológico de *C. aspersum* criados en granja frente a metacercarias *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843, sería una forma plausible de controlar la braquilaimosis. Por el momento, ni los caracoles de mercado, ni los caracoles de granjas se desparasitan con tratamiento farmacológico (Segade y cols., 2011).

1.5.1. Praziquantel

Así pues, el tratamiento farmacológico de *C. aspersum* criados en granja frente a metacercarias *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843, sería una forma plausible de controlar

la braquilaimosis. Por el momento, ni los caracoles de mercado, ni los caracoles de granjas se desparasitan con tratamiento farmacológico (Segade y cols., 2011).

El praziquantel (Figura 11) forma parte del arsenal terapéutico de elección para las trematodosis y es de primera elección en el caso de esquistosomosis. Se sintetizó en los años 70, en los laboratorios Merck y fue comercializado a principios de los 80 por los laboratorios Bayer. Actúa frente a un amplio espectro de trematodos con un excelente perfil de seguridad, por lo que también se utiliza como tratamiento de elección para la clonorchosis, opistorquiosis, paragonimosis y otras helmintosis intestinales (Keiser y Utzinger, 2009). El praziquantel está autorizado tanto en uso humano como veterinario. Su efectividad a nivel veterinario ha sido demostrada en desparasitación de animales de consumo humano como peces, cabras y ganado ovino (EMA, 1996; Johansen y cols., 1996; Shirakashi y cols., 2012).

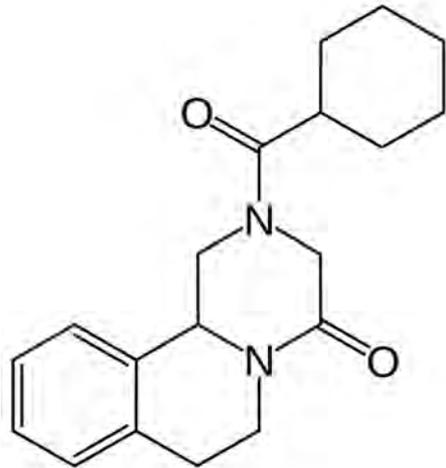


Figura 11. Praziquantel. Free commons, vía Wikipedia.

Si bien el praziquantel es ampliamente utilizado, su mecanismo de acción sigue siendo desconocido. Su escasa eficacia frente a helmintos no platelmintos sugiere que su diana podría estar presente únicamente en este filo. Actualmente parece contrastado que el praziquantel produce una disrupción de la homeostasis de Ca^{2+} en los esquistosomas (Greenberg, 2006), iniciándose así una cascada de sucesos, como la contracción sostenida de la musculatura del parásito, vacuolización y disrupción del tegumento, que conducen a la eliminación de los parásitos del hospedador.

Alteraciones en la bicapa fosfolipídica de las membranas y en su fluidez (Harder y cols., 1988; Lima y cols., 1994), disminución del glutatión que permitiría al sistema inmune del hospedador ser más efectivo frente al parásito (Ribeiro y cols., 1998), y unión con la actina que conllevaría la disrupción del tegumento (Tallima y El Ridi, 2007), son efectos propuestos también para el praziquantel, si bien son escasas las evidencias que conectan estos efectos con potenciales dianas.

Las preguntas clásicas sobre el mecanismo de acción del praziquantel encuadran su diana terapéutica en proteínas de membrana (canales, receptores, transportadores) y en alguna proteína citosólica o fosfolípidos y las localizan fundamentalmente en el tegumento, la

Introducción

musculatura, las terminaciones nerviosas o las neuronas centrales. Todo ello sin descartar otras dianas y localizaciones que nuevos hallazgos puedan sugerir. Sin embargo, todo puede reducirse a una sola pregunta: ¿Cómo se ha producido el desequilibrio homeostático del Ca^{2+} ? (Greenberg, 2006).

Teniendo en cuenta que los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes son los puntos de entrada de Ca^{2+} extracelular se propuso su implicación en la acción del fármaco. Sin embargo, solamente el clonaje y expresión de las proteínas de los canales en sistemas heterólogos ha permitido apuntar a su actuación en la acción del praziquantel (Kohn y cols., 2001a, b; 2003). Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes son complejos de proteínas de membrana activados por cambios en el potencial de membrana que permiten a los iones su flujo a través de la membrana celular, así como la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Están constituidos por una subunidad α_1 que conforma cuatro dominios homólogos dispuestos alrededor de un poro, conteniendo cada uno de ellos seis regiones transmembranales, dos de las cuales se relacionan mediante un *loop* que actúa como filtro selectivo de iones. Los canales de alto voltaje presentan proteínas accesorias (β y α_2/δ) que modulan la actividad de α_1 .

Los esquistosomas expresan, al menos, dos tipos de subunidades β , en tanto que otros invertebrados expresan un único tipo. De forma destacada, una de estas dos subunidades manifiesta propiedades estructurales y funcionales únicas, estando presente solamente en *Schistosoma* sp. (y posiblemente en los platelmintos), y no en otros invertebrados o vertebrados, y explica la actuación del praziquantel al incrementar el flujo de Ca^{2+} , la cual está relacionada con la ausencia de puntos de fosforilación de la proteinkinasa C en ella. La modificación del dominio de interacción de esta subunidad fue capaz de crear una resistencia al praziquantel, planteándose pues la hipótesis de que el sitio de acción del antihelmíntico se hallaba en los canales Ca^{2+} (Kohn y cols., 2001). Sin embargo, posteriormente, aparecen *Schistosoma* sp. con cierta resistencia al praziquantel, no basada en ningún tipo de modificación en sus subunidades β . Consecuentemente, la modificación anteriormente mencionada puede ser considerada como una vía para adquirir resistencia al praziquantel y no como sitio de acción de éste (Kohn y cols., 2001; William y cols., 2001; Valle y cols., 2003; Salvador-Recatalà y Greenberg, 2012).

Actualmente se dispone de los genomas de *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum* (GeneDB y SchistoDB) lo cual permite mejorar el conocimiento del metabolismo de cada una de estas especies de *Schistosoma*, impulsando un cambio de paradigma en cuanto a la investigación de fármacos antiesquistosomiales. Se ha fomentado el desarrollo de modelos de diseño molecular mediante la construcción computacional de mapas metabólicos para

Schistosoma sp., cuyo objetivo consiste en predecir reacciones clave que sean esenciales para la homeostasis celular y, por lo tanto, adecuadas para desarrollar fármacos (Mafud y cols., 2016). Este cambio de paradigma no exime el estudio del mecanismo del praziquantel, al contrario, abre una nueva puerta.

1.5.2. Estrategias de administración veterinarias

El praziquantel se ha utilizado tanto a nivel de laboratorio como de campo. Concretamente, en laboratorio, mediante inyección vía subcutánea como dosis única (Awad y Probert, 1991), o por vía oral como dosis única mediante sonda gástrica o jeringa (Lee, 1985; Xiao y cols., 1988, Gonçalves y cols., 2013). En cambio, en granjas o reservas naturales, la vía oral es la principal, siendo la dosis única, con ayuda de una jeringa para su administración, menos frecuente (Johansen y cols., 1996) que la administración del fármaco (o mezcla premedicamentosa destinada a uso veterinario) con el pienso *ad libitum*, estrategia más habitual no sólo para el praziquantel (Williams y cols., 2007; Shirakashi y cols., 2012) sino para otros fármacos (Kyriakis y cols., 1997; Hoflack y cols., 2001; Lia y cols., 2010; Michels y cols., 2011; Fei y cols., 2013;) en los que la dosis se calcula según los consumos alimentarios de cada animal. Sin embargo, una granja de helicultura se distingue de las anteriormente mencionadas por la gran cantidad de caracoles que se crían en ellas (Chevallier, 1986). Por este motivo la forma más sencilla de administrar un fármaco a los caracoles, y que sea viable económicamente, sería aprovechar el mismo sistema de alimentación del que se dispone en las granjas (1.2.3).

1.6. Seguridad alimentaria

1.6.1. El residuo de praziquantel permitido en un alimento de consumo humano

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) fija como Cantidad Diaria Aceptable (ADI) de praziquantel 0'17 mg/kg de peso corporal (10 mg de praziquantel/persona) mediante la ingestión de productos alimentarios obtenidos de animales que han recibido un tratamiento veterinario (EMA, 1996). En consecuencia, si los caracoles se tratan con praziquantel, la seguridad alimentaria debe garantizarse y el desarrollo de un método bioanalítico para la determinación cuantitativa del praziquantel en la matriz biológica de *C. aspersum* es imprescindible (EMA, 1996, 1998). En este sentido la técnica analítica a emplear ha de permitir la determinación cuantitativa de praziquantel en la concentración que la EMA considera como ingesta aceptable, indicada anteriormente, y, asimismo, ha de cumplir con los requisitos establecidos por la normativa VICH para la validación del método analítico. Para este propósito se escogió la técnica analítica “High Performance Liquid

Introducción

Chromatography Tandem Mass Spectrometry” (HPLC-MS/MS) ya que puede identificar el praziquantel sin equívocos para su posterior cuantificación.

1.6.2. La técnica de determinación HPLC-MS/MS

La determinación cualitativa y cuantitativa de praziquantel en el marco de una matriz compleja, como es el gasterópodo *C. aspersum*, requiere el empleo de técnicas analíticas que permitan, en primer lugar, separar el componente de la matriz y, en segundo lugar, cuantificarlo. Las técnicas cromatográficas ofrecen, en este sentido, posibilidades analíticas efectivas. Entre ellas, la técnica de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) se ha utilizado para la determinación cuantitativa



Figura 12. Sistema HPLC-MS/MS de los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona (Fotografía: Laia Gállego).

de praziquantel en plasma y tejido muscular de pez (Kim y cols., 2001, 2003) así como en plasma humano (Riddid, 2002; Hanpitakpong y cols., 2004) entre otras matrices. Actualmente, la High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry– Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) que combina HPLC con espectrometría de masas, es una técnica muy potente y segura para la determinación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos (plasma, orina) o tejidos (Zhao, 2005; Jiang y cols., 2012).

Desde un punto de vista cualitativo, la mayor limitación que presenta la técnica de HPLC es la imposibilidad de identificar inequívocamente el analito ya que la identificación se basa en la comparación de tiempo de retención y, en ocasiones, varias moléculas pueden coincidir en cuanto a su tiempo de retención. Sin embargo, la combinación de HPLC y espectrometría de masas permite identificar compuestos con las mismas características de tiempo de retención o similares, fundamentándose en su masa y permitiendo la obtención de información estructural y referente al peso molecular del analito de interés (Ardrey, 2003). La técnica de separación de HPLC-MS/MS opera con una unidad de HPLC encargada de separar el analito del resto de la matriz, una interficie para adecuar las condiciones de la muestra y una unidad de espectrometría de masas, donde se realiza la determinación cualitativa definitiva y cuantitativa del analito de interés (Ardrey, 2003; Dass, 2007).

Unidad de HPLC+DAD: Para la separación de moléculas hidrofóbicas, como es el caso del praziquantel, es adecuado el uso de cromatografías reversas que implica el

acondicionamiento de la columna mediante hidrocarburos. El protocolo de análisis se inicia con el control tanto del equilibrio de la columna como de la polaridad de la fase móvil. Éste se consigue mediante la adición de modificadores orgánicos como el acetonitrilo. La muestra es inyectada y sus componentes se adsorben en la columna, iniciándose el proceso de desorción dependiendo del gradiente de la fase móvil. La parte de la muestra correspondiente al tiempo de retención del analito pasa por un detector DAD (“Diode Array Detector”) que realiza un barrido simultáneo en todas las longitudes de onda resultando un espectro UV que recoge distintas intensidades. Este espectro proporciona información analítica de este punto del proceso. A continuación, sólo esta parte de la muestra continúa el procedimiento analítico y pasa a la interficie de ionización por electro spray (Ardrey, 2003; Dass, 2007).

Ionización por electro spray como interficie entre la unidad de HPLC y la unidad de espectrometría de masas: La interficie de ionización por electro spray tiene como función adecuar la parte de la muestra donde se encuentra el analito a las condiciones de trabajo de la unidad de espectrometría de masas, que necesita trabajar en el vacío y con iones. Para ello se ha de evaporar el disolvente y producir los iones. Esencialmente, la ionización por electro spray ha de conseguir pulverizar la muestra y formar un flujo de gotitas cargadas, mediante la aplicación de un campo eléctrico intenso. La evaporación del disolvente convierte estas gotitas cargadas en iones de fase gaseosa (Ardrey, 2003; Dass, 2007).

El proceso incluye el paso de la parte de la muestra separada anteriormente en HPLC, por un capilar de acero inoxidable, a presión atmosférica, cuyo extremo final, llamado contra-electrodo, tiene un alto potencial (3-4 kV). La diferencia de potencial entre el tubo y el contra-electrodo produce un campo electrostático suficientemente fuerte como para dispersar la muestra en una pulverización de gotitas cargadas cuya evaporación se induce mediante un flujo de nitrógeno caliente. Durante el proceso de evaporación, los iones disueltos pasan a la atmósfera y son transportados desde la zona de presión atmosférica a zonas de baja presión, mediante una placa cargada del signo contrario a la carga del ion de interés. Los iones son finalmente conducidos, mediante bombas de vacío, a la unidad de espectrometría de masas (Ardrey, 2003; Dass, 2007).

Unidad de espectrometría de masas en tándem triple cuadrupol: La unidad de espectrometría de masas trabaja en un vacío de 10^{-7} mmHg para ofrecer a los iones un camino libre medio suficiente para poder alcanzar ulteriormente el detector. Esto es debido a que en condiciones de presión atmosférica la distancia que pueden recorrer los iones corresponde a 10^{-8} m, y, en cambio, en las condiciones de vacío anteriormente mencionadas esta distancia se incrementa a 10 m, facilitando, así, su llegada al detector. En la primera celda de la unidad de espectrometría de masas, se produce la separación de iones según su peso molecular

Introducción

mediante un filtro cuadropolar consistente en cuatro antenas de radiofrecuencia y corriente continua. Dependiendo del voltaje seleccionado, los iones de cierto peso molecular seguirán una trayectoria estable hacia el filtro cuadropolar y alcanzarán el detector para pasar a la celda de fragmentación (también llamada celda de colisión), donde el segundo filtro cuadropol los hará oscilar, colisionando entre ellos y fragmentándose. Por último, estos fragmentos pasan a la última celda donde se encuentra el tercer filtro cuadropol, y donde se cuantifica y confirma el analito. La fragmentación permite asegurar que el ion que se cuantifica corresponde al ion de interés y no a otro que tuviera el mismo peso molecular. Finalmente se obtiene un ionograma con los datos de la muestra para ulteriores cálculos de determinación (Ardrey, 2003; Dass, 2007).

1.7. Efecto del praziquantel en los trematodos

En el contexto mencionado en anteriormente (1.5.1) en el que se desconoce el mecanismo de acción del praziquantel, la evaluación del efecto de éste a nivel de ultraestructura en metacercarias *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 recuperadas de *C. aspersum* que han recibido tratamiento, puede aportar información útil.

1.7.1. Ultraestructura de los trematodos: tegumento y gastrodermis

En general, la superficie corporal de los trematodos adultos está cubierta por un tegumento que consiste en un citoplasma sincitial externo conectado mediante puentes citoplasmáticos a porciones nucleadas del citoplasma denominadas células tegumentarias, localizadas en el parénquima. El sincitio yace sobre una lámina basal y ésta descansa, a su vez, sobre capas de musculatura circular y longitudinal. La matriz del sincitio contiene mitocondrias, ribosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, cuerpos celulares tegumentarios y otras inclusiones características del protoplasma (Smyth y Halton, 1983). Las paredes de los ciegos de los trematodos consisten en un epitelio lineal o gastrodermis que se sustenta sobre una fina capa de lámina basal y una capa de fibras musculares circulares y longitudinales (Smyth y Halton, 1983). La gastrodermis puede ser sincitial o celular (compuesta por una monocapa de células) donde los microvili son numerosos en la superficie apical siendo sus funciones las de absorción y secreción (Fried, 1997). Aunque las metacercarias *Brachylaima* spp. siguen la estructura tegumentaria típica de los trematodos, no se enquistan en el hospedador intermediario y presentan un glicocálix extenso y filamentoso (Harris y cols., 1974; Smyth y Halton, 1983; Ferrer y cols., 2001).

1.7.2. Efecto del praziquantel en la ultraestructura de trematodos

La microscopía electrónica se ha utilizado para estudiar los efectos del praziquantel en distintos trematodos como *Fibricola seoulensis* (Byong-Seol y cols., 1985; Lee, 1985),

Paragonimus westermani (Lee y cols., 1987), *Echinostoma paraensei* (Ferraz y cols., 2012; Gonçalves y cols., 2013), *Schistosoma* sp. (Wang y Zhou, 1988; Awad y Probert, 1991; Xiao y cols., 2011; El-Shabasy y cols., 2015) y *Clonorchis sinensis* (Qian y cols., 1988).

Los efectos del praziquantel descritos mediante la utilización de técnicas de microscopía electrónica de rastreo (SEM) han sido: la formación de ampollas (“blebbling”) a lo largo del tegumento del trematodo, especialmente en la zona de las ventosas oral y ventral; la descamación del tegumento y la formación de “agujeros” en *F. seoulensis* (Byong-Seol y cols., 1985; Lee, 1985), *P. westermani* (Lee y cols., 1987), *E. paraensei* (Ferraz y cols., 2012; Gonçalves y cols., 2013), *Schistosoma* sp. (Wang y Zhou, 1988; Awad y Probert, 1991; Jiraungkoorskul y cols., 2005; Xiao y cols., 2011; Reda y cols., 2012) y *C. sinensis* (Qian y cols., 1988). La retracción de espinas ha sido descrita en *E. paraensei* (en la zona del collar peristómico) y en *P. westermani*. Y mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) el principal efecto descrito en todas las especies (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. magreowiei*, *E. paraensei*, y *C. sinensis*) ha sido la vacuolización tegumentaria (Qian y cols., 1988; Wang y Zhou, 1988; Xiao y cols., 1988; Awad y Probert 1991; Gonçalves y cols., 2013, El-Shabasy cols., 2015). En *S. mansoni* se ha descrito inflamación (“swelling”) en el tegumento y las espinas, así como un aumento de los cuerpos celulares tegumentarios (El-Shabasy y cols., 2015). En *S. japonicum* fue detectada inflamación en el tegumento y en la musculatura sub-tegumental, así como degeneración mitocondrial. En un ensayo *in vivo* se detectó una disminución de los cuerpos celulares tegumentarios (Wang y Zhou, 1988), y, sin embargo, en el estudio *in vitro* de Xiao y cols. (1988) sólo se menciona la presencia de estos cuerpos celulares tegumentarios. En *E. paraensei* se encontró inflamación, degeneración mitocondrial y presencia de vacuolas con material floculante así como una disminución de los cuerpos celulares tegumentarios (Gonçalves y cols., 2013). En *C. sinensis* se ha descrito la degeneración mitocondrial y daño muscular (Qian y cols., 1988). Las alteraciones de la gastrodermis solo han sido mencionadas en *S. mansoni* y *S. magrebowiew* (Awad y Probert, 1991; El-Shabasy y cols., 2015).

CAPÍTULO 2: Objetivos

El trabajo presentado en esta tesis está enfocado al desarrollo de un tratamiento antihelmíntico para *C. aspersum* parasitados por metacercarias del género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 que permitiera su viabilidad económica en granjas de helicultura como herramienta de control de la braquilaimosis. En este contexto, se plantean los objetivos que se enumeran a continuación:

- Determinar las prevalencias de parasitación de *C. aspersum* por metacercarias *Brachylaima* spp. en mercados de abasto.
- Estudiar la localización geográfica y la estacionalidad como posibles predictores de riesgo.
- Evaluar el posible efecto de los flujos de comercio internacionales como dispersores geográficos de *Brachylaima* spp.
- Estudiar la eficacia del tratamiento con praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum in vivo*.
- Establecer la dosis y pauta adecuada para la correcta desparasitación de *C. aspersum* mediante tratamiento con praziquantel.
- Desarrollar y validar un método bioanalítico mediante HPLC-MS-MS que permita la detección y cuantificación de praziquantel en la matriz biológica constituida por *C. aspersum* según la guía de validación de métodos bioanalíticos de la Agencia Europea del Medicamento EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (EMA, 2011).
- Proponer el protocolo de cuantificación del fármaco para su detección cuantitativa en los límites fijados por la legislación.
- Determinar el residuo de praziquantel en la matriz biológica estudiada para establecer su adecuación alimentaria en función de la ingesta diaria aceptable indicada por la Agencia del Medicamento europea.
- Estudiar los efectos del praziquantel sobre las metacercarias *Brachylaima* spp. a nivel de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión *in vivo*.

CAPÍTULO 3: Resultados

- Brachylaimiasis: *Brachylaima* spp. (Digenea: Brachylaimidae) metacercariae parasitizing the edible snail *Cornu aspersum* (Helicidae) in Spanish public marketplaces and health associated risk factors. Journal of Parasitology. Accept, minor changes, 6th June 2017.
Autores: Mercedes Gracenea and Laia Gállego.
Revista 3^{er} cuartil (23/36) con índice de impacto 1'394 [InCites Journal Citation Reports 2015].
- Terrestrial edible land snails as vectors for geographic dissemination of *Brachylaima* species. Journal of Parasitology, 2014; 100, 674–678.
Autores: Laia Gállego, Olga González-Moreno y Mercedes Gracenea.
Revista 3^{er} cuartil (21/37) con índice de impacto 1'258 [InCites Journal Citation Reports 2013].
- Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae (Trematoda: Brachylaimidae) parasitizing the edible landsnail *Cornu aspersum* and its HPLC-MS/MS residue determination. Experimental Parasitology, 2015; 157, 92-102.
Autores: Laia Gállego y Mercedes Gracenea.
Revista 3^{er} cuartil (19/36) con índice de impacto 1'638 [InCites Journal Citation Reports 2014].
- Effect of praziquantel on the tegument and digestive epithelium ultrastructure of *Brachylaima* sp. metacercariae parasitizing the land snail *Cornu aspersum*. Journal of Parasitology, 2016; 102, 520-532.
Autores: Laia Gállego y Mercedes Gracenea.
Revista 3^{er} cuartil (23/36) con índice de impacto 1'394 [InCites Journal Citation Reports 2015].

3.1. Publicación #1: Brachylaimiasis: *Brachylaima* spp. (Digenea: Brachylaimidae) metacercariae parasitizing the edible snail *Cornu aspersum* (Helicidae) in Spanish public marketplaces and health associated risk factors

Tal y como se ha mencionado en el capítulo 1, los caracoles terrestres *C. aspersum* resultan frecuentemente parasitados por metacercarias *Brachylaima* spp. y éstas pueden parasitar al hombre si los caracoles se ingieren crudos o poco cocidos, produciendo la braquilaimosis (Butcher y cols., 1996, 1998; Butcher and Groove, 2001; Gracenea y González-Moreno, 2002; Butcher, 2006; Gracenea y cols., 2009). Este trabajo exploratorio tiene, como uno de sus objetivos, estudiar, por primera vez, la prevalencia de parasitación de *C. aspersum* por metacercarias *Brachylaima* spp. en los mercados de diversas ciudades españolas, por su interés sanitario y seguridad alimentaria. Para ello se analizaron estacionalmente 3710 ejemplares de *C. aspersum* destinados a consumo humano procedentes de Barcelona (n=2525), Bilbao (n=207), Madrid (n=290), Tudela (n=301), Valencia (n=163) y Zaragoza (n=224), a lo largo de 5 años. Se examinó el riñón de cada ejemplar, se identificaron las metacercarias *Brachylaima* spp., y se registró la carga individual de metacercarias de cada espécimen (Gracenea and González-Moreno, 2002). Se calculó la prevalencia global, la prevalencia estacional, la prevalencia por ciudad y la prevalencia por mercado en el caso de Barcelona (95% de intervalo de confianza) (Daniel, 2002; Zelmer, 2013). Para calcular la carga metacercarial se utilizó la media de Williams (Media de Williams=(media geométrica $(x + \delta) \cdot \delta$) donde $\delta=1$) para poder acomodar los valores de los caracoles no parasitados (Williams, 1937; Alexander, 2012).

La prevalencia global hallada fue de 41'97% (95% CI: 40'38%-45'56%). El mercado de Tudela alcanzó tanto el máximo de prevalencia estacional como el de la media de Williams de todo el estudio, llegando a valores de 93'57% y 3'09 respectivamente, ambos en otoño. Globalmente, la prevalencia más alta del estudio también fue detectada en otoño (58'65%), en tanto que el invierno mostró el valor más bajo (22'64%). Se detectó el efecto de la estacionalidad en la prevalencia, que se incrementa desde verano hasta otoño y disminuye en invierno.

Un total de 96 *Brachylaima* adultos experimentales fueron obtenidos mediante infestaciones experimental de ratones de laboratorio (*Mus musculus* ♀♀ adultos) con las metacercarias procedentes de los caracoles analizados (Gracenea and González-Moreno, 2002), demostrándose así la viabilidad de las mismas. Adicionalmente, la obtención de los adultos permite su determinación específica mediante la aplicación de análisis morfométricos, concretamente el Análisis de Componentes Principales (APC, PCA siglas en inglés). Los resultados obtenidos en los Componentes Principales (PC) mediante esta herramienta

Resultados

estadística mostraron que PC1-PC3 explican el 71'26% de la varianza. El gráfico de dispersión mostró una clara separación en dos grupos correspondientes a *B. llobregatensis* y *B. mascomai*. Concretamente, los adultos de Barcelona fueron identificados como *B. mascomai* (n=56) y *B. llobregatensis* (n=17). Bilbao presentó principalmente adultos de *B. llobregatensis* (n=8) y sólo un adulto de *B. mascomai*. Los adultos de Tudela se identificaron como *B. mascomai* (n=7), Valencia presentó adultos de *B. mascomai* (n=3) y *B. llobregatensis* (n=1) y los adultos identificados en Zaragoza fueron todos *B. llobregatensis* (n=3).

Los factores asociados al riesgo de parasitación humana fueron determinados mediante regresión logística con el objetivo de predecir la probabilidad de adquirir caracoles parasitados utilizando la ciudad y la estación como predictores. El modelo demostró una predicción general correcta del 79'0% con un efecto de riesgo significativo ($p=0.001$) en la interacción Barcelona-Otoño (2.551-38.442), un efecto de protección significativo ($p=0.049$) en la interacción Tudela-Primavera (0.076-0.997), un efecto de riesgo significativo ($p<0.001$) en la interacción Tudela-Otoño (4.330-78.584) y un efecto de protección significativo ($p=0.014$) en la interacción Valencia-Primavera (0.033-0.687).

Las metacercarias *Brachylaima* spp. muestran un carácter cosmopolita favorecido por la presencia de *C. aspersum* en prácticamente todos los países. Este molusco, de origen mediterráneo, está presente actualmente en todos los continentes, y es uno de los mejores ejemplos de especies accidentalmente o intencionadamente introducidas en los últimos siglos. Cabe destacar que su interés gastronómico favorece, adicionalmente, su dispersión a través del comercio internacional. Los informes sobre el cambio climático que preconizan un aumento de la temperatura y de la frecuencia e intensidad de las precipitaciones resultan, asimismo, positivos para la dispersión de la especie, dado su carácter “*hotter is better*” e incrementan su eficacia como vector de *Brachylaima* al favorecer la cercariogénesis, la emergencia cercariana y su infestación por metacercarias. La presencia de muy diversos reservorios animales es importante, también, para la dispersión del parásito que es detectado continuamente en nuevas áreas y hospedadores

La exposición humana a las metacercarias *Brachylaima* spp. es elevada en países donde *C. aspersum* es considerado un alimento. Solamente en España, las autoridades estiman que el consumo anual de caracoles es de aproximadamente 16 millones de kilogramos.

La prevalencia global de *Brachylaima* spp. con un valor tan elevado, 41'97%, no puede ignorarse y debería ser un motivo de preocupación por parte de las autoridades sanitarias.

La ausencia de trazabilidad y de control sanitario de los ejemplares de *C. aspersum* adquiribles en los mercados públicos, la inespecífica sintomatología de la braquilaimosis, el pequeño tamaño de los huevos del parásito en heces de las personas parasitadas, los flujos en los mercados internacionales y los cambios climáticos que favorecen la dispersión geográfica del vector en la naturaleza, diseñan un escenario muy favorable para esta trematodosis alimentaria, hasta ahora olvidada.

Journal of Parasitology

**BRACHYLAIMIASIS: BRACHYLAIMA SPP. (DIGENEA: BRACHYLAIMIDAE)
METACERCARIAE PARASITIZING THE EDIBLE SNAIL CORNU ASPERSUM
(HELICIDAE) IN SPANISH PUBLIC MARKETPLACES AND HEALTH ASSOCIATED
RISK FACTORS**
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	17-29R2
Full Title:	BRACHYLAIMIASIS: BRACHYLAIMA SPP. (DIGENEA: BRACHYLAIMIDAE) METACERCARIAE PARASITIZING THE EDIBLE SNAIL CORNU ASPERSUM (HELICIDAE) IN SPANISH PUBLIC MARKETPLACES AND HEALTH ASSOCIATED RISK FACTORS
Short Title:	RH: GRACENEA AND GÁLLEGO - BRACHYLAIMIASIS AND C. ASPERSUM
Article Type:	Regular Article
Corresponding Author:	Mercedes Gracenea, Ph.D Pharmacist University of Barcelona Barcelona, Barcelona SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Barcelona
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Mercedes Gracenea, Ph.D Pharmacist
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Mercedes Gracenea, Ph.D Pharmacist Laia Gállego, Ph.D Student, Pharmacist
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>The edible land snail <i>Cornu aspersum</i> (Pulmonata: Stylommatophora) acts as a second intermediate host in the terrestrial life-cycle of the trematodes <i>Brachylaima</i> spp., harboring unencysted metacercariae in its kidney. The ingestion of undercooked infected snails by humans may allow metacercariae to potentially develop to adult stage in the intestine causing brachylaimiasis, as already seen in the case of a given <i>Brachylaima</i> species in Australia. Prevalence and dynamics of <i>C. aspersum</i> parasitization by <i>Brachylaima</i> spp. metacercariae in specimens intended for human consumption in Spanish marketplaces were studied. A total of 3,710 <i>C. aspersum</i> specimens were analyzed over 5 years, which were obtained from public marketplaces in the Spanish cities of Barcelona, Bilbao, Madrid, Tudela, Valencia and Zaragoza. The overall prevalence was 41.97% (95% CI: 40.38%-45.56%). The Tudela marketplace had the highest values for both the seasonal prevalence and abundance in all studies during autumn (93.57% and 3.09, respectively). This market also gave the highest individual metacercarial burden recorded, 212 metacercariae in a single specimen. Overall, the highest prevalence of <i>Brachylaima</i> spp. occurred in autumn (58.65%) and the lowest in winter (22.64%). There was a seasonal effect on prevalence, which increased from summer to autumn and then decreased in winter. A total of 96 experimental <i>Brachylaima</i> adults were obtained from the metacercariae parasitizing the analyzed snails. These were identified through morphometric tools (Principal Component Analysis) as <i>Brachylaima mascomai</i> (56 in Barcelona, 1 in Bilbao, 7 in Tudela, and 3 in Valencia), and <i>Brachylaima llobregatensis</i> (17 in Barcelona, 8 in Bilbao, 1 in Valencia, and 3 in Zaragoza). Logistic regression modeling, conducted to predict the probability of purchasing parasitized snails using city and season as predictors, showed a correct prediction overall of 79.0% with a significant ($p = 0.001$) risk effect in the Barcelona-autumn interaction (2.551-38.442), a significant ($p = 0.049$) protection effect in the Tudela-spring interaction (0.076-0.997), a significant ($p < 0.001$) risk effect in the Tudela-autumn interaction (4.330-78.584) and a significant ($p = 0.014$)</p>

RH: GRACENEA AND GÁLLEGO – BRACHYLAIMIASIS AND *C. ASPERSUM***BRACHYLAIMIASIS: *BRACHYLAIMA* SPP. (DIGENEA: BRACHYLAIMIDAE) METACERCARIAE PARASITIZING THE EDIBLE SNAIL *CORNU ASPERSUM* (HELICIDAE) IN SPANISH PUBLIC MARKETPLACES AND HEALTH ASSOCIATED RISK FACTORS****Mercedes Gracenea* and Laia Gállego**

Laboratory of Parasitology, Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 80208 Barcelona, Spain. *Author for correspondence: Tel: (+34) 934024502; Fax: (+34) 934024504. E-mail: gracenea@ub.edu

ABSTRACT: The edible land snail *Cornu aspersum* (Pulmonata: Stylommatophora) acts as a second intermediate host in the terrestrial life-cycle of the trematodes *Brachylaima* spp., harboring unencysted metacercariae in its kidney. The ingestion of undercooked infected snails by humans may allow metacercariae to potentially develop to adult stage in the intestine causing brachylaimiasis, as already seen in the case of a given *Brachylaima* species in Australia. Prevalence and dynamics of *C. aspersum* parasitization by *Brachylaima* spp. metacercariae in specimens intended for human consumption in Spanish marketplaces were studied. A total of 3,710 *C. aspersum* specimens were analyzed over 5 years, which were obtained from public marketplaces in the Spanish cities of Barcelona, Bilbao, Madrid, Tudela, Valencia and Zaragoza. The overall prevalence was 41.97% (95% CI: 40.38%-45.56%). The Tudela marketplace had the highest values for both the seasonal prevalence and abundance in all studies during autumn (93.57% and 3.09, respectively). This market also gave the highest individual metacercarial burden recorded, 212 metacercariae in a single specimen. Overall, the highest prevalence of *Brachylaima* spp. occurred in autumn (58.65%) and the lowest in winter (22.64%). There was a seasonal effect on prevalence, which increased from summer to autumn and then decreased in winter. A total of 96 experimental *Brachylaima* adults were obtained from the metacercariae parasitizing the analyzed snails. These were identified through morphometric tools (Principal Component Analysis) as *Brachylaima mascomai* (56 in Barcelona, 1 in Bilbao, 7 in Tudela, and 3 in Valencia), and *Brachylaima llobregatensis* (17 in Barcelona, 8 in Bilbao, 1 in Valencia, and 3 in Zaragoza). Logistic regression modeling, conducted to predict the probability of purchasing parasitized snails using city and season as predictors, showed a correct prediction overall of 79.0% with a significant ($p = 0.001$) risk effect in the Barcelona-autumn interaction (2.551-38.442), a significant ($p = 0.049$) protection effect in the Tudela-spring interaction (0.076-0.997), a significant ($p < 0.001$) risk effect in the Tudela-autumn interaction (4.330-78.584) and a significant ($p = 0.014$) protection effect in the Valencia-spring interaction (0.033-0.687). The high overall prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae should be a matter of concern for public health authorities, mainly in countries where *C. aspersum* is consumed.

Human brachylaimiasis has been reported in Australia, the hematophagous *Brachylaima cribbi* (Trematoda: Brachylaimidae) adults parasitizing the intestine and producing abdominal pain, recurrent diarrhea, and eosinophilia (Butcher et al., 1996; Butcher, 1998, 2006; Butcher and Grove, 2001; Butcher et al., 2002). Brachylaimiasis has been classified as a pathology with an expected mortality rate in humans (without treatment) between of 5 and 10% (Meerburg et al., 2009). Unencysted *Brachylaima* metacercariae often parasitize the kidney (Mas-Coma and Montoliu, 1986; Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006) of the terrestrial edible snail of commercial interest *Cornu aspersum* (= syn. *Helix aspersa*) (Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) (Nordisiek, 2006; Juříčková and Kaopounek, 2009), which acts as second intermediate host. The *Brachylaima* metacercariae can be ingested by vertebrate animals and humans if snails are eaten, and they potentially develop to adults causing brachylaimiasis. A gastropod also acts as the first intermediate host in the terrestrial *Brachylaima*

life-cycle (Yamaguti, 1975), harbouring cercariogenous sporocysts in the hepatopancreas. Cercariae at various stages of development fill the lumen (germ balls, developing cercariae, fully mature cercariae) (Mas-Coma et al., 1987a, b, c; Gracenea and González-Moreno, 2002). Terrestrial, fully mature cercariae exit, triggered by the availability of water even in small quantity, and crawl actively on the humid substrate until they contact with the gastropod second intermediate host.

Brachylaima spp. metacercariae have a cosmopolitan character, enhanced by the worldwide distribution of their vectors, the helcid snails, which include *C. aspersum*. The anthropogenic *C. aspersum* form is now present in many areas with a Mediterranean, temperate or even a subtropical climate (e.g., the American and African continents, the Mascarene Islands, Oceania, and Asia) (Ansart et al., 2009; Guiller and Madec, 2010). Nowadays, both its dispersion to new geographical areas and its parasitization by *Brachylaima* spp. metacercariae may be driven by the ongoing global climate change, mainly by the increase of the temperature and

Resultados

changes in precipitation, as the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2013) and the Fifth Assessment Report (IPCC, 2014) predict.

The increase in global temperature may improve the development of *C. aspersum* populations because their thermal sensitivity fitted with the “hotter is better” scenario (Gaitán-Espitia, 2013), where populations adapted to warmer temperatures showed higher optimal temperature and higher maximum performance. In addition, higher temperatures accelerate cercariae production within snails (Poulin, 2006), thus increasing their infectivity and causing a high level of infection in the second intermediate host. In *Brachylaima*, cercariogenous sporocysts remain empty of full formed cercariae after each emergence period and cercariogenesis re-starts from these germ-balls (Mas-Coma et al., 1987c), occurring even more quickly if temperature is high. Mature cercariae fill up the sporocysts, which are ready for a new emergence in a period shorter than the normal one, clearly contributing to increase the prevalence of parasitization of *C. aspersum* by *Brachylaima* spp. metacercariae.

The increase of the number of precipitation periods favors (Trenberth, 2011) the availability of water acting as a trigger to induce the output of the *Brachylaima* cercariae (Mas-Coma et al., 1987a; Gracenea et al., 1992) in their terrestrial life-cycle, thus favoring the frequency of the cercarial emergence episodes. Moreover, *Brachylaima* is an *r*-strategist organism (Mas-Coma et al., 1987b) with short generation times and rapid population growth rates, making them very responsive to climate changes (Hughes, 2000). Both, higher temperatures and water availability, enhance the mobility of *C. aspersum* (Dahirel et al., 2014), and the emergence of the snail from its shell, thereby increasing the frequency of cercarial emergence and metacercarial parasitization of second intermediate hosts (Mas-Coma et al., 1987a).

Brachylaima spp. metacercariae belonging to the genus *Brachylaima* Dujardin, 1843 *sensu lato* are unencysted, and can be clearly identified and differentiated from other genera within the family Brachylaimidae Joyeux and Foley, 1930 through morpho-anatomical characters (Yamaguti, 1971, 1975; Schell, 1985; Mas-Coma and Montoliu, 1986; Gracenea and

González-Moreno, 2002; Pojmanska, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006; Segade et al., 2011). The main morphologic characters for diagnosis include: oval flattened body; the acetabulum usually closer to the mid-body than the anterior end; ceca straight or somewhat sinuous; testes tandem in the posterior third of the body; an ovary intertesticular; a genital pore immediately anterior, anterolateral or ventral to the anterior testis; and vitellaria commencing, to varying levels, at or near the acetabulum and extending into lateral fields as far back as the anterior testis.

The approach of the *Brachylaima* adults to a specific level within the genus can be achieved by using the morphometric measurements reported by Cribb (1990). In this sense, Principal Component Analysis (PCA) for morphometric studies in biological fields, such as parasitology, has been described and reviewed by Rohlf and Marcus (1993) and Klingenberg (1996). Hahn et al. (2011) used PCA to distinguish *Gyrodactylus teuchis* from *Gyrodactylus salaris*. Hanelt and Janovy Jr. (2002) differentiated the non-adult stages of *Gordius robustus*, *Paragordius varius* and *Chordodes morgani* using PCA. Recently, PCA has been employed to distinguish *Fasciola hepatica* from *F. gigantica* (Ashrafi et al., 2015), as well as, to develop aids in describing new species, like *Ligophorus* sp. (Soo and Lim, 2015). Furthermore, Gállego et al. (2014) differentiated two species of *Brachylaima* adults through PCA.

The first objective of this work was to explore the prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae in *C. aspersum* intended for human public consumption in Spanish marketplaces. The second objective was to demonstrate the infective capability of the metacercariae through the obtention of the experimental adult specimens in mammals. The third objective was to approach these experimental adults to the *Brachylaima* species previously detected in *C. aspersum* in Spain through morphometric tools (PCA), to assess the dispersion of *Brachylaima* species. At last, the dynamics of the snail parasitization in marketplaces was assessed by analyzing the geographical localization of the snails (Spanish cities) and seasonality as contributing factors to the risk of human parasitization and brachylaimiasis.

MATERIALS AND METHODS

C. aspersum specimens (n = 3,710) intended for human consumption were seasonally sampled along 5 yr from public marketplaces in the Spanish cities where *C. aspersum* consumption is the highest: Barcelona (n = 2,525; Bilbao (n = 207); Madrid (n = 290); Tudela (n = 301); Valencia (n = 163) and Zaragoza (n = 224) (Fig. 1; Table I). All the sampled snails were adults, as confirmed by the presence of a reflected lip at the shell aperture (Ansart and Vernon, 2004). Size was recorded in all specimens (3.10 ± 0.40 cm x 2.39 ± 0.44 cm). After sampling, specimens were moved to the laboratory and maintained in plastic boxes (23 cm x 13 cm x 8 cm) covered with a net. They were kept at room temperature (mean $21.3 \text{ C} \pm 0.7$, relative humidity $33.9\% \pm 6.0$), under natural light-dark cycle, and were sprayed with tap water twice a day. Snail food (mainly fresh lettuce) was provided daily until analysis, which was usually performed within 48 hr after sampling. Only alive specimens were analyzed.

Individual metacercarial burden was recorded in each snail by kidney examination under a binocular stereomicroscope Leica MZ6 (Leica Microsystems [Schweiz] AG, Heerbrugg, Switzerland). *Brachylaima* spp. metacercariae were identified and counted (Gracenea and González-Moreno, 2002). The global prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae in snails, seasonal prevalence and city-marketplace prevalence 95% confidence intervals (CI) were calculated (Daniel, 2002; Zelmer, 2013). The mean intensity of parasitization was calculated for each marketplace (number of metacercariae/number of parasitized specimens). Williams mean was used (Williams mean = (geometric mean $(x + \delta) - \delta$) where $\delta=1$) to calculate the mean metacercarial burden (number of metacercariae/number of total specimens analyzed) (Williams, 1937).

To test the infective capability of the *Brachylaima* metacercariae, laboratory-reared mice (adult *Mus musculus* ICR (CD-1) ♀♀) were orally infected with the metacercariae removed from the infected snails (Gracenea and González-Moreno, 2002). Experimental adults were obtained that were between 15 and 19 days old, enabling their comparison with morphometric tools. These adults were fixed in Bouin solution, stained with Grenacher's borax carmine, and

mounted in Canada balsam. Eighteen metric variables (in μm) were measured on the adults under a Laborlux Leica microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) using a calibrated ocular micrometer (Mas-Coma et al., 1984).

Principal Component Analysis (PCA) was performed to approach the species of these experimental *Brachylaima* adults to the *B. mascomai* and *B. llobregatensis* species previously detected in *C. aspersum* occurring in the wild, and in imported marketplaces specimens in Spain. In PCA, the adults were compared with 25 experimental adults of *B. mascomai* and *B. llobregatensis* (also 15-19 days old) obtained from experimental metacercariae parasitizing *C. aspersum* and *Otala punctata* (Müller, 1774) respectively (Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006), and with 17 experimental Algerian and South African *Brachylaima* adults (also 15-19 days old) obtained from *Brachylaima* spp. metacercariae parasitizing imported *C. aspersum* specimens (Gállego et al., 2014).

Logistic regression analysis was conducted to predict the probability of purchasing parasitized snails and, thus, favoring the risk of human parasitization and brachylaimiasis acquisition, in Barcelona, Bilbao, Madrid, Valencia, Tudela, and Zaragoza (Hosmer et al., 2000), using city and season as predictors. The sample size effect for Barcelona was corrected by randomizing 12% of the samples. The main effects of the variables city and season were assessed by obtaining Cramer's V values (Chi Square, $p \leq 0.05$). The built model considering city-season interaction was assessed by log likelihood, Cox and Snell square r , and Nagelkerke square R values. Statistical analyses were performed using SPSS v.21 for PC (IBM Corporation, Armonk, New York).

RESULTS

Prevalence, seasonality, intensity of parasitization and individual metacercarial burden in *C. aspersum*

In total, 3,710 snails from Spanish marketplaces were collected and examined for *Brachylaima* spp. metacercariae. Each selected Spanish city was sampled every season over 5 years. The main results per city and their confidence intervals are presented in Fig. 1. The

Resultados

overall prevalence of metacercariae in all the snails collected was 41.97% (95% CI: 40.38%-45.56%) (Table I).

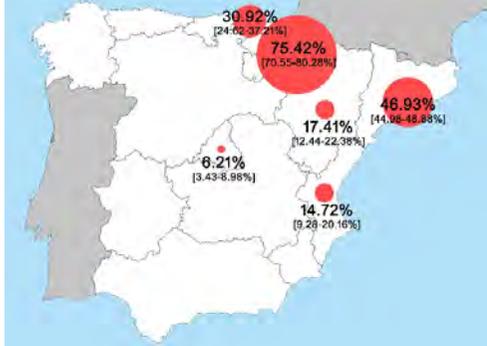


Fig. 1 Geographic localization of prospected marketplaces and *Brachylaima* sp. metacercariae

The highest individual metacercarial burden, 212 metacercariae in a single *C. aspersum* specimen, was recorded in the Tudela marketplace. This market, also had the highest prevalence of *Brachylaima* infection (75.42%) and Williams mean (2.25). The mean intensity value of parasitization (8.63) was the second highest recorded out of all the cities tested (Table I). The highest mean intensity was found in the Madrid marketplace, reaching 8.89 metacercariae/infected snail despite the overall prevalence being low (6.21%) in this marketplace.

In terms of seasonality of *Brachylaima* prevalence (Table II), the Tudela marketplace had the highest values for both seasonal prevalence and Williams mean for all studies in autumn (93.57% and 3.09, respectively). Overall, the highest prevalence of *Brachylaima* was found in autumn (58.65%), winter showing the lowest occurrence (22.64%).

A seasonal effect on prevalence was observed in almost all the marketplaces (Fig. 2), increasing from summer to autumn, when it peaked, before decreasing in winter. The Williams mean values also reflected the seasonality of the prevalence; the Williams mean increased with increasing prevalence, and vice-versa.

C. aspersum parasitization by *Brachylaima* spp. metacercariae was followed up monthly during 2010 in 1 of the marketplaces in Barcelona (Fig. 3). The prevalence peaked twice, first in spring and then in autumn when it reached 62%. It is very remarkable that the Williams mean, in terms of abundance, corresponded exactly to the

variations in prevalence. This was not the case for the mean intensity, which provides interesting data: for the notable increase in prevalence in spring, the mean intensity decreased, progressively increasing during the beginning of summer and aligning with the abundance and prevalence only until the beginning of autumn, when it started to decrease. The prevalence and Williams mean increased during autumn and in beginning of winter (2010-2011), when the mean intensity reached 12 metacercariae/specimen and the prevalence dropped from 62% to 53%.

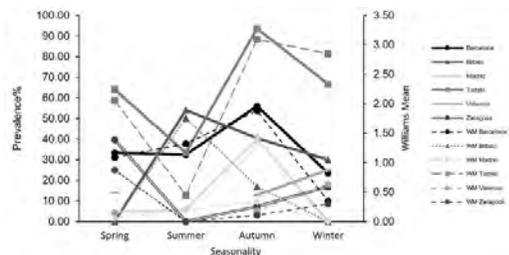


Fig. 2 Seasonal dynamics of prevalence (%) and mean metacercarial burden (Williams Mean) of *Brachylaima* sp. metacercariae parasitizing *C. aspersum* in Spanish marketplaces.

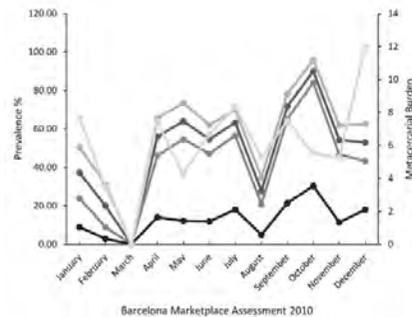


Fig. 3 Monthly prevalence (%) and mean metacercarial burden of *Brachylaima* spp. metacercariae parasitizing *C. aspersum* in the Boqueria marketplace, Barcelona, Spain. 95% CI: confidence intervals; WM: Williams mean.

The results obtained over 2 yr in Barcelona, showed that the prevalence of *Brachylaima* started in 2010, giving a value of 37% in winter, when the mean intensity was 7.68 metacercariae/specimen, and finishing at 53% in autumn, when the mean intensity was 12. Comparing these data with the seasonal prevalence and Williams mean of 2009, an increase in both parameters can be observed for 2010 (Figs. 4, 5). This suggests that *Brachylaima* spp. metacercariae are completely established in that geographical area.

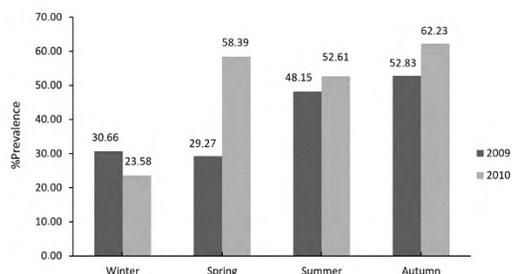


Fig. 4 Seasonal prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae parasitizing *Cornu aspersum* in Barcelona marketplaces in 2009 and 2010.

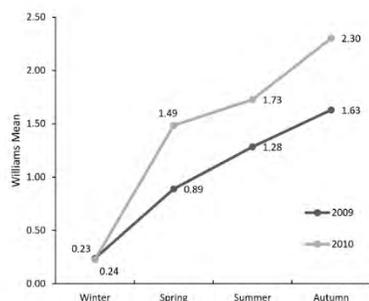


Fig. 5 Seasonal variation of Williams Mean in terms of abundance of *Brachylaima* spp. metacercariae parasitizing *C. aspersum* in Barcelona marketplaces.

Principal Components Analysis (PCA) of the experimental *Brachylaima* spp. adults

A total of 96 experimental *Brachylaima* spp. adults (15-19 days old) were obtained by orally infecting mice (*Mus musculus* ICR(CD-1) ♀♀), giving a global success rate of 65.52%. Of these, 73 adults were developed from the metacercariae parasitizing *C. aspersum* sampled from Barcelona, 9 from Bilbao, 7 from Tudela, 4 from Valencia and 3 from Zaragoza.

Experimental adults were found in the first (duodenum) and second part (jejunum) of the intestine. Morphometric data were obtained as described in Material and Methods and PCA performed to ascribe the adults to *B. mascomai* or *B. llobregatensis*, the two species most frequently reported in the Mediterranean area (Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006) (Table III).

Results from PCA analysis showed that Principal Component 1 (PC1) (eigenvalue 10.159) accounted for 56.44% of the variance. PC1 and PC2 (eigenvalue 1.373) explained the 64.07% of variance and PC1-PC3 (eigenvalue 1.294) 71.26%. In PC1, the variables with positive loading were body length (0.924), testis-1 length (0.914), testis-2 length (0.907), testis-1 width (0.902) and ventral sucker-testis-1 distance (0.902). The variables with negative loading were egg length (-0.748) and egg width (-0.560). PC1 loadings were mostly positive, confirming the relationship of this first component with size. PC2-PC3 loadings were positive and negative, interpreted as reflecting shape. Scatter plots with PC1 and PC2 (Fig. 6) showed 2 distinguishing groups corresponding to *B. llobregatensis* and *B. mascomai*.

The experimental adults from Barcelona were identified as *B. mascomai* (n = 56) and *B. llobregatensis* (n = 17), while those from Bilbao were mainly *B. llobregatensis* (n = 8), with only 1 adult belonging to *B. mascomai*. The experimental adults from Tudela were identified as *B. mascomai* (n = 7), those from Valencia were *B. mascomai* (n = 3) and *B. llobregatensis* (n = 1), and the adults from Zaragoza were all *B. llobregatensis* (n = 3).

Marketplace	Prevalence %	95% CI		WM	Mean Intensity	Max	Min
		Lower Limit	Upper Limit				
Barcelona (n=2525)	46.93	44.98	48.88	0.89	7.83	76	0
Bilbao (n=207)	30.92	24.62	37.21	0.60	5.17	31	0
Madrid (n=290)	6.21	3.43	8.98	0.08	8.89	65	0
Tudela (n=301)	75.42	70.55	80.28	2.25	8.63	212	0
Valencia (n=163)	14.72	9.28	20.16	0.22	3.75	14	0
Zaragoza (n=224)	17.41	12.44	22.38	0.31	5.77	37	0
Global (n= 3710)	41.97	40.38	43.56	0.90	7.20	212	0

Table I. *Brachylaima* sp. metacercariae parasitizing *C. aspersum* in Spanish marketplaces; 95%CI: confidence intervals; WM: Williams Mean; Mean Intensity: number of metacercariae/positive snails; Max, Min: extreme values for intensity; n: number of analyzed specimens.

Resultados

Marketplace	Seasonal Prevalence %				WM	WM	WM	WM
	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring	Summer	Autumn	Winter
Barcelona (n=2525)	33.33	32.48	55.93	23.49	1.09	1.32	1.88	0.35
Bilbao (n=207)	0.00	54.00	40.43	30.00	0	1.75	0.59	0
Madrid (n=290)	4.63	5.88	40.00	0.00	0.06	0.19	0.34	0
Tudela (n=301)	64.00	33.33	93.57	66.67	2.06	0.45	3.09	2.85
Valencia (n=163)	14.00	NA	12.90	25.00	0.15	NA	0.19	0.63
Zaragoza (n=224)	39.62	0.00	7.41	16.87	0.87	0	0.11	0.30
Global (n= 3710)	33.71	44.09	58.65	22.64	-	-	-	-

Table II. Seasonal prevalence (%) and mean metacercarial burden of *Brachylaima* sp. metacercariae parasitizing *C. aspersum* in Spanish marketplaces. WM: Williams Mean; NA: Not Available; n: number of analyzed specimens.

City	mean±SD				
	Barcelona (n=73)	Bilbao (n=9)	Tudela (n=7)	Valencia (n=4)	Zaragoza (n=3)
BL	4.774,03±1.521,02	2.406,55±794,85	6.458,18±714,28	4.729,55±2.355,67	1.664,69±298,60
BW	614,08±111,56	554,90±91,67	622,44±58,58	620,16±92,83	454,26±21,17
OSL	269,84±33,44	235,44±50,01	262,18±28,26	247,99±47,79	194,30±11,60
OSW	249,02±37,47	216,21±55,88	222,33±38,15	239,45±38,85	194,30±11,60
VSL	282,62±43,71	239,92±37,37	277,50±36,06	264,35±54,57	187,60±14,12
VSW	253,57±54,90	228,03±40,40	260,06±33,14	250,61±44,66	187,57±8,31
PhL	159,17±31,34	118,26±17,84	122,04±14,38	174,01±27,93	115,24±14,12
PhW	162,94±36,68	167,48±19,00	158,36±17,47	127,36±26,50	111,22±26,16
Te1L	412,45±126,89	224,00±69,06	594,22±27,45	398,63±208,44	137,34±35,49
Te1W	334,59±111,82	162,36±61,10	415,52±43,71	352,09±151,62	92,78±21,17
Te2L	451,78±155,16	268,18±91,07	595,67±80,90	471,66±173,30	135,00±25,98
Te2W	332,75±108,09	205,94±67,99	386,46±49,13	271,28±148,50	100,83±13,77
OvL	244,45±63,46	165,20±41,80	308,01±20,94	228,41±71,39	118,32±23,25
OvW	189,29±67,07	115,42±56,21	242,63±21,52	180,53±78,04	93,29±18,51
EggL	24,65±3,64	26,67±1,77	22,50±1,44	27,50±3,54	25,83±1,44
EggW	14,47±1,45	14,17±1,25	14,29±1,22	15,46±1,52	15,00±0,00
OS-VS	665,09±244,66	542,28±127,92	796,61±266,02	705,35±365,80	421,68±80,42
VS-Te1	2.134,91±905,94	707,92±342,70	3.326,96±561,50	2.061,00±1.307,65	437,37±100,06

Table III. Descriptive statistics for experimental *Brachylaima* adults obtained from marketplace metacercariae (Barcelona, Bilbao, Tudela, Valencia, Zaragoza). SD: standard deviation; n: number of specimens measured; BL: body length; BW: body width; OSL: oral sucker length; OSW: oral sucker width; VSL: ventral sucker length; VSW: ventral sucker width; PhL: pharynx length; PhW: pharynx width; Te1L: testis 1 length; Te1W: testis 1 width; Te2L: testis 2 length; Te2W: testis 2 width; OvL: ovary length; OvW: ovary width; EggL: egg length; EggW: egg width; OS-VS: distance between OS and VS; VS-Te1: distance between VS and Te1; n: number of analyzed specimens. All measurements are in μm .

Logistic regression modeling

Logistic regression analysis was conducted to predict the probability of purchasing parasitized snails using city and season as predictors. The data set contained Barcelona (n = 2,525), Bilbao (n = 207), Madrid (n = 290), Tudela (n = 301), Valencia (n = 163) and Zaragoza (n = 224). The data set was analyzed by logistic regression, using all the samples from Bilbao, Madrid, Valencia, and Zaragoza and only 12% of the randomized samples from Barcelona. The main effects of the variables city and season were assessed by obtaining Cramer's V values of 0.526 (Chi square test = 408.599, $p < 0.001$) and 0.302 (Chi square test = 134.968, $p < 0.001$) respectively. A model was built on the city-season interaction (log likelihood = 1247.501, Cox and Snell square R = 0.362, and Nagelkerke square R = 0.498), giving an overall correct prediction of 79.0%, accounting 85.5% for non-parasitized and 66.8% for parasitized snails. CI 95% EXP(B) showed a significant ($p = 0.001$) risk effect in the Barcelona-Autumn interaction (2.551-38.442), a significant ($p = 0.049$) protection effect in the Tudela-Spring interaction (0.076-0.997), a significant ($p < 0.001$) risk effect in the Tudela-autumn interaction (4.330-78.584) and a significant ($p = 0.014$) protection effect in the Valencia-spring interaction (0.033-0.687).

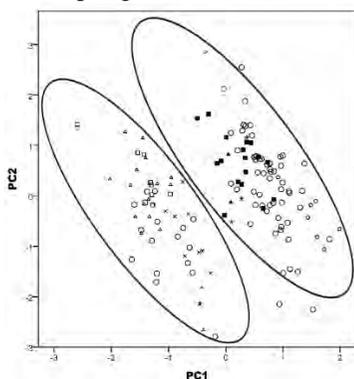


Fig. 6 Principal Component Analysis dispersion plot. PC1 (Principal Component 1). PC2 (Principal Component 2) ■ Experimental adults of *B. mascomai*. □ Experimental adults of *B. llobregatensis*. △ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Algerian metacercariae. ▲ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural South African metacercariae. ○ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Barcelona metacercariae. × *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Bilbao metacercariae. ★ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Valencia metacercariae. ⬡ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Tudela metacercariae. ▲ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Zaragoza metacercariae.

DISCUSSION

The results from this work revealed a high overall prevalence (41.97%) of *Brachylaima* spp. metacercariae in *C. aspersum* specimens from Spanish marketplaces. The impact of *Brachylaima* metacercariae on public health is currently unknown due to a lack of studies and the non-specific symptomatology of brachylaimiasis, which is difficult to diagnose clinically (Butcher et al., 1996; Butcher, 1998). The etiologic diagnosis is also difficult due to the small size of the *Brachylaima* eggs (25-30 μm in length) (Cribb, 1990; Butcher et al., 2002; Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006). Thus, it is possible that many cases of brachylaimiasis could be misdiagnosed.

The consumption of land snails as usual food, global trade of snails and exposure to *Brachylaima* metacercariae through parasitized snails are important factors in human parasitization. Spratt (2005) discussed about capricious food chains and parasitic consequences for people, reporting the occurrence of brachylaimiasis from the accidental ingestion of infected snails in Australia. But, ingestion of snails is not accidental, it is usual in many countries such as China, France, Spain, Italy, Romania, and others (United Nations, 2014), thus increasing the risk of human parasitization in these regions. The host food web matrix differs from 1 geographical area to another (Sukhdeo, 2012). The distribution systems to local and international markets play the major role in exposure to food-borne parasites and in the emergence of parasites in different countries (Dorny et al., 2009). In this sense, globalization acts as a key facilitating the spread of infectious diseases with negative consequences on food security (Robertson et al., 2014). The 2 *Brachylaima* species detected in the present work, *B. llobregatensis* and *B. mascomai*, were both reported in 3 of the 6 studied cities. These species have also been recorded in geographically distant areas such as Algeria and South Africa (Gállego et al., 2014), thus emphasizing the role of global trade in the parasite dissemination.

Spanish authorities estimate the total consumption of snails per year to be about 16 million kilograms (Spanish Ministry of Agriculture Food and Environment, 2016). This

Resultados

amount of snails, considering that a “tapa” (1 dish) typically contains about 25 snails, would be equivalent to 80 million “tapas” dishes. Hence, 80 million-people could be eating snails every year in Spain alone. The general consumption of edible snails in the world is about 450.000 tons/year (Istituto Internazionale di Elicicoltura Cherasco, 2015). If the same approach is applied, about 2,250 million people could be eating snails every year, and, thus be exposed to *Brachylaima* spp. Recently, Giannelli et al. (2016) estimated that 300 million people are affected by gastropod-borne helminths in their review.

The high prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae in *C. aspersum* in this work can be explained through reservoirs. In this sense, *Brachylaima* genus parasitizes a broad range of final hosts, in Spain: small mammals, birds, lizards, dogs, lynx, red foxes, beech martens, European badgers, and seagull (Roca et al., 1989; Roca and Hornero, 1991; Guisantes et al., 1994; Segovia et al., 2000; Sospedra, 2000; Torres et al., 2001). Domestic reservoirs like *Rattus rattus*, *R. norvegicus*, and *Mus musculus* can contribute to bring the cycle close to humans. Indeed, 14.3% of mice have been observed to be naturally infected with *B. aspersae* in Spain (Segade et al., 2011). Furthermore, the prevalence of *B. mascomai* and *B. llobregatensis* in naturally infected rats has been shown to be 34.46% for *R. norvegicus* (5/13) and 66.67% for *R. rattus* (2/3) (González-Moreno and Gracenea, 2006). Additionally, 9 *Brachylaima* species have been reported to parasitize vertebrates and mollusks in Spain (Table IV) and 4 parasitizing edible snails in other countries (Table V).

The results obtained in the present work with the application of the logistic regression model over the prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae parasitizing *C. aspersum* using city and season as predictors showed an overall prediction of 79.0% which is similar to that obtained by Bennema et al. (2011), whose model reached an overall prediction of 75.0% for *Fasciola hepatica* distribution based on management and climatic/environmental factors. In the present work, a significant risk effect was found for the Tudela-autumn (4.330-78.584) and Barcelona-autumn (2.551-38.442) interactions. The highest prevalence of *Brachylaima* spp. metacercariae in *C. aspersum* was detected in the

Tudela marketplace, thus associating it with a higher risk of brachylaimiasis. Barcelona showed the second highest prevalence of *C. aspersum* parasitization, also associating it with a higher risk of human parasitization.

Noticeably, autumn was the season involved in both interactions. These findings agree with the seasonality of *Brachylaima* spp. prevalence observed in both places, where prevalence peaked in autumn. Climatic conditions and seasonality have been linked to the risk profiling of schistosomiasis (Walz et al., 2015), the prediction of *Lymnaea stagnalis* parasitization by digenean flukes (Żbikowska, 1998), and the infection of secondary hosts by different water snails transmitting trematodes (Madsen et al., 2015).

The association between seasonality and *C. aspersum* parasitization is reinforced by some of the characteristics of the snail, which decreases its dormancy periods acting as “hotter is better” in changing scenarios (Gaitán-Espitia et al., 2013). The 2 periods of dormancy at the end of winter and summer, which land snails use to develop (Dimitriadis, 1992; Porcel et al., 1996), could become shorter under more humid and warmer conditions, and both the snail activity and mobility could be increased (Dahirel et al., 2014). These conditions also improve the transmission of *Brachylaima* spp. This fact would be aligned with the recent review on climate change and trematodiasis (Mas-Coma et al., 2009). The authors concluded that an increase in the vector population could increase the distribution and presence of *Brachylaima* spp., mainly because its r-strategist character (Mas-Coma et al., 1987a, 2009) becomes *Brachylaima* highly responsive to climate change. Cercarial shedding is directly linked to the activity of *C. aspersum* (Mas-Coma et al., 1987b). Favorable environmental conditions for the land snail also promote cercarial shedding. Moreover, the cold hardness of *C. aspersum* is up to -10 C and, even with low temperatures, if it raises to 20 C with humidity conditions, snails continue to be active, thus enabling its geographical dispersion (Ansart and Vernon, 2004; Ansart et al., 2008).

The main factors promoting or not the infection are summarized (Table VI).

Brachylaima species	Vertebrate definitive host	Molusc second intermediate host	References
<i>B. fulvus</i>	<i>Crocidura russula</i> , <i>C. suaveolens</i> , <i>C. leucodon</i> , <i>Sorex araneus</i> , <i>S. minutus</i> , <i>Neomys fodiens</i> , <i>N. anomalus</i>	<i>Zonitoides nitidus</i> , <i>Goniodiscus rotundatus</i> , <i>Oxychylus orientalis</i> , <i>Aegopinella apipedostoma</i> , <i>Euconulus fulvus</i> , <i>Deroceras</i> sp.	(Mas-Coma, 1977; Mas-Coma and Gállego, 1975)
<i>B. mascomai</i>	<i>R. rattus</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Crocidura russula</i> , <i>Meriones unguiculatus</i> , <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Cornu aspersum</i> , <i>Otala punctata</i> , <i>Theba pisana</i>	(Gracenea and González-Moreno, 2002)
<i>B. llobregatensis</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Cornu aspersum</i> , <i>Otala punctata</i> , <i>Theba pisana</i>	(González-Moreno and Gracenea, 2006)
<i>B. ruminae</i>	<i>Eliomys quernicus ophiusae</i> , <i>R. rattus</i> , <i>M. musculus</i> .	<i>Otala punctata</i> , <i>Eobania vermiculata</i> , <i>Theba pisana</i>	(Mas-Coma and Montoliu, 1986)
<i>B. aspersae</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Helix aspersa aspersa</i> , <i>Helix aspersa maxima</i>	(Segade et al., 2013)
<i>B. erinacei</i>	<i>Erinaceus europaeus</i> , <i>Meles taxus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Passer domesticus</i> *	<i>Helix hortensis</i> , <i>Helicella arigonis</i>	(Simon-Vicente, 1955)
<i>B. recurvum</i>	<i>A. sylvaticus</i> , <i>Micromus minutus</i>	<i>Cyclostoma elegans</i>	(Mas-Coma and Feliu, 1977)
<i>B. simoni</i>	<i>C. russula</i>	NA	(Feliu et al., 1986)
<i>B. arcuatus</i>	<i>Corvus glandarius</i> , <i>Turdus philomelos</i> , <i>T. pilaris</i> , <i>T. musicus</i> , <i>Pica pica</i> , <i>Merula merula</i> , <i>Turdus iliacus</i>		(Yamaguti, 1971; Díaz et al., 2001)

Table IV. *Brachylaima* species reported in Spain. Vertebrate definitive hosts harbour adults and molusk second intermediate hosts harbour metacercariae. NA: Not available. * Experimental.

Brachylaima species	Vertebrate definitive host	Molusc second intermediate host	Countries	References
<i>B. cribbi</i>	<i>Mus domesticus</i> , <i>humans</i>	<i>Cerutuella virgata</i> *, <i>Cornu aspersum</i> *	Australia	(Butcher et al., 1996; Butcher, 1998; Butcher and Grove, 2001; Butcher et al., 2002)
<i>B. suis</i>	<i>Suis suis</i>	<i>Helix (cantaretus) aperta</i>	Tunisia	(Balozet, 1936, 1937a, b)
<i>B. fuscatus</i>	<i>Coturnix coturnix</i> , <i>Turdus merula</i> *, <i>Streptopelia risoria</i> *	<i>Helix pisana</i> , <i>Cornu aspersum</i>	Italy, France, North Africa, Philippines, Turkey	(Valero, 1986; Joyeux et al., 1934; Macchioni, 1968, 1970; Fischthal and Kuntz, 1973)
<i>B. nicolli</i>	<i>Passer domesticus</i>	<i>Cornu aspersum</i>	Russia, France	(Macchioni, 1970; Witemberg, 1925; Joyeux et al., 1932a, b)

Table V. *Brachylaima* species reported in countries other than Spain. Vertebrate definitive hosts harbour adults and edible moluscs act as second intermediate hosts harbouring metacercariae. * Experimental.

Parasite-related factors	Effect on the <i>Brachylaima</i> sp. cycle	References
↑ Temperature	Increase in the frequency of the cercarial shedding.	(Mas-Coma et al., 1987b)
↑ Humidity	Induction of the cercarial shedding in infected snails.	
Snail-related factors		
↑ Temperature	Increase in the activity of the snail, more contact with other snails or dormancy if extreme temperatures occurs.	(Dimitriadis, 1992)
↑ Humidity	Increase in the activity of the snail, more contact with other snails.	(Ansart and Vernon, 2004; Ansart et al., 2008)
↓ Dormancy Periods	Increase in the activity of the snail.	(Porcel et al., 1996)
↑ Population density	Increase the contact between snails.	(Spanish Ministry of Agriculture Food and Environment, 2016)
Farm Managing		
↓ Hygiene/maintainance	Entrance of little predators such as mice which can contaminate the farm with faeces.	(Spanish Ministry of Agriculture Food and Environment, 2016)
↑ Parasitological survey	Prevention of the introduction <i>Brachylaima</i> sp. cycle in the farm.	(Segade et al., 2013; Gállego and Gracenea, 2015)
Human-related factors		
Gastronomy	Snails considered as a pest or as a food	(Spratt, 2005; Gállego and Gracenea, 2015)
Culinary behaviours	Snails consumed raw/insufficiently cooked	(Walz et al., 2015)

Table VI. Risk profiling of *Brachylaima* spp. infection in *C. aspersum* and humans.

CONCLUSIONS

The high overall prevalence (41.97%) of *Brachylaima* spp. metacercariae should be a matter of concern for public health authorities. The lack of traceability in marketplaces and sanitary control for this livestock, the unspecific symptomatology of brachylaimiasis, the small size of *Brachylaima* eggs in stool samples, the international market fluxes due to globalization and the climate change favoring the vector dispersion in wild, could contribute to the emergence of the brachylaimiasis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Joan Guàrdia from the Applied Statistical Advanced Techniques Research Group of the University of Barcelona for his assistance in developing the logistic regression models. The authors thank José R. Arrébola Burgos his help in identifying the snails. The present work was partially granted by the Ministry of Science and Innovation of the Government of Spain (grant number AGL2007-61575).

LITERATURE CITED

- Ansart A., A. Guiller, and L. Madec. 2009. CABI Invasive Species Compendium: *Cornu aspersum*. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/26821>. Accessed 22th February 2017.
- Ansart, A., P. A. Aulne, L. Madec, and P. Vernon. 2008. Influence of temperature acclimation and gut content on the supercooling ability of the land snail *Cornu aspersum* Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **150**: 14–20.
- Ansart, A., and P. Vernon. 2004. Cold hardiness abilities vary with the size of the land snail *Cornu aspersum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **139**: 205–211.
- Ashrafi, K., M. A Valero, R. V. Peixoto, P. Artigas, M. Panova, and S. Mas-Coma. 2015. Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan Iran: Relationships between zonal overlap and phenotypic traits. Infection, Genetics and Evolution **31**: 95–109.
- Balozet, L. 1936. Sur un Brachylaemus de l'intestin du porc. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France **9**: 93.
- Balozet, L. 1937a. *Brachylaemus suis* Mihi 1936, Trématode de l'intestin du porc. Rôle pathogène et cycle évolutif. Les archives de l'Institut Pasteur Tunis **26**: 36–67.
- Balozet, L. 1937b. Cycle évolutif de *Brachylaemus suis*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris **204**: 622–624.
- Bennema, S. C., E. Ducheyne, J. Vercruyse, E. Claerebout, G. Hendrickx, and J. Charlier. 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle

- in a temperate climate zone. *International Journal for Parasitology* **41**: 225–233.
- Butcher, A. R. 1998. First report of the isolation of an adult worm of the genus *Brachylaima* (Digenea: Brachylaimidae), from the gastrointestinal tract of a human. *International Journal for Parasitology* **28**: 607–610.
- Butcher, A. R. 2006. Review of Thirteen Cases of *Brachylaima cribbi* Intestinal Fluke Worm Infection in Children and Adults from South Australia. Annual Scientific Meeting Exhibition of the Australian Society for Microbiology (ASM 2006), Gold Coast Convention and Exhibition Centre, Queensland Australia. *Annals of the ACTM, a Journal of Tropical and Travel Medicine* **7**: 32–33.
- Butcher, A. R., J. K. Brealey, D. I. Grove, and R. B. Dymock. 2002. *Brachylaima cribbi* (Digenea: Brachylaimidae): Scanning electron microscopical observations of the life-cycle stages. *Journal of Helminthology* **76**: 207–215.
- Butcher, A. R., and D. I. Grove. 2001. Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Systematic Parasitology* **49**: 211–221.
- Butcher, A. R., G. A. Talbot, R. E. Norton, M. D. Kirk, T. H. Cribb, J. R. Forsyth, B. Knight, and A. S. Cameron. 1996. Locally acquired *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) intestinal fluke infection in two South Australian infants. *Medical Journal of Australia* **164**: 475–478.
- Cribb, T. H. 1990. Introduction of a *Brachylaima* species (Digenea: Brachylaimidae) to Australia. *International Journal for Parasitology* **20**: 789–796.
- Dahirel, M., A. Ansart, and L. Madec. 2014. Stage- and weather-dependent dispersal in the brown garden snail *Cornu aspersum*. *Population Ecology* **56**: 227–237.
- Daniel, W. W., 2002. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa Wiley, Ciudad de México, México, 915 p.
- Díaz, V., M. Campos, J. Lozano, and I. Mañas. 2001. First finding of *Brachylaima arcuatus* Dujardin, 1845 (Digenean Trematode) in the intestine of *Turdus italicus* (red-wing) in Spain. *Revista Ibérica de Parasitología R&RP* **1**: 1–3.
- Dimitriadis, V. K., 1992. Effect of starvation and hibernation on the fine structural morphology of digestive gland cells of the snail *Helix lucorum*. *Malacologia* **34**: 63–73.
- Dorny, P., N. Praet, N. Deckers, and S. Gabriel. 2009. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology* **163**: 196–206.
- Feliu, C., S. Mas-Coma, I. Montoliu, and J. Gállego. 1986. *Brachylaima simoni* sp. n. (Trematoda: Brachylaimidae) a parasite of the shrew *Crocodyrus russula* (Hermann, 1780) (Insectivora: Soricidae) from the Pityusic Islands of Ibiza (Balearics). *Helminthologia* **23**: 65–72.
- Fischthal, J., and R. Kuntz. 1973. Brachylaimid and Dicrocoeliid Trematodes of Birds from Palawan Island, Philippines. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **41**: 94–104.
- Gaitán-Espitia, J. D., M. Belén Arias, M. A. Lardies, and R. F. Nespolo. 2013. Variation in thermal sensitivity and thermal tolerances in an invasive species across a climatic gradient: lessons from the land snail *Cornu aspersum*. *PLoS One* **8**: e70662.
- Gállego, L., and M. Gracenea. 2015. Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae (Trematoda: Brachylaimidae) parasitizing the edible landsnail *Cornu aspersum* and its HPLC-MS/MS residue determination. *Experimental Parasitology* **157**: 92–102.
- Gállego, L., O. González-Moreno, and M. Gracenea. 2014. Terrestrial edible land snails as vectors for geographic dissemination of *Brachylaima* species. *Journal of Parasitology* **100**: 674–678.
- Giannelli, A., C. Cantacessi, V. Colella, F. Dantas-Torres, and D. Otranto. 2016. Gastropod-Borne Helminths: A look at the snail-parasite interplay. *Trends in Parasitology* **32**: 255–264.
- González-Moreno, O., and M. Gracenea. 2006. Life cycle and description of a new species of brachylaimid (Trematoda: Digenea) in Spain. *Journal of Parasitology* **92**: 1305–1312.
- Gracenea, M., and O. González-Moreno. 2002. Life cycle of *Brachylaima mascomai* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rats in the Llobregat Delta (Spain). *Journal of Parasitology* **88**: 124–133.
- Gracenea, M., I. Montoliu, and S. Mas-Coma. 1992. Chronobiology and parasites: Acrophases in the cercarial emergence of a brachylaimid trematode (Digenea) and ethology of its target host. *In Chronobiology & Chronomedicine. Basic research and applications*. A. Diez-Noguera and T. Cambras (eds.). European Society for Chronobiology, Peterlang GmbH, Frankfurt am Main., p. 91–96.
- Guiller, A., and L. Madec. 2010. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: A new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *Evolutionary Biology* **10**: 18.
- Guisantes, J. A., A. Benito, J. J. Estibalez, and S. Mas-Coma. 1994. High parasite burdens by *Brachylaima (Brachylaima)* sp. (Trematoda: Brachylaimidae) in two dogs in the North of Spain. *Research and Reviews in Parasitology* **54**: 255–258.
- Hahn, C., T. A. Bakke, L. Bachmann, S. Weiss, and P. D. Harris. 2011. Morphometric and molecular characterization of *Gyrodactylus teuchis* Lutraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae) from an Austrian brown trout population. *Parasitology International* **60**: 480–487.
- Hanelt, B., and J. Janovy Jr. 2002. Morphometric analysis of nonadult characters of common species of American gordiids (Nematomorpha: Gordioidea). *Journal of Parasitology* **88**: 557–562.
- Hosmer, D. W., S. Lemeshow, and R. X. Sturdivant. 2000. *Applied logistic regression*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 479 p.
- Hughes, I. I. 2000. Biological consequences of global warming: Is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 56–61.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2013. Summary for Policymakers. *In Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. T. F. Stocker, D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P. M. Midgley (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 1–33.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2014. Summary for policymakers. *In Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. C. B. Field, V. R. Barros, D. J. Dokken, K. J. Mach, M. D. Mastrandrea, T. E. Bilir, M. Chatterjee, K. L. Ebi, Y. O. Estrada, R. C. Genova, B. Girma, E. S.

Resultados

- Kissel, A. N. Levy, S. MacCracken, P. R. Mastrandrea, and L. L. White (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 1–32.
- Istituto Internazionale di Elicicoltura Cherasco. 2015. The market. www.istitutodielicicoltura.com/ Accessed 30th March 2017.
- Joyeux, C. H., J. G. Baer, and J. Timon-David. 1932a. Reserches sur le cycle évolutif des Trématodes appartenant au genre *Brachylaemus* Dujardin (syn. *Harmostomum* Braun). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris **195**: 972–973.
- Joyeux, C. H., J. G. Baer, and J. Timon-David. 1932b. Le développement du trématode *Brachylaemus* (*Brachylaemus*) *nicolli* (Witenberg). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris **109**: 464–466.
- Joyeux, C. H., J. G. Baer, and J. Timon-David. 1934. Reserches sur les trematodes du genre *Brachylemus* Dujardin (syn. *Harmonstomum* Braun). Bulletin Biologique de la France et de la Belgique **68**: 385–418.
- Juričková L., and F. Kaopounek. 2009. *Helix (Cornu) aspersa* (O.F. Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) in the Czech Republic. Malacologica Bohemoslovaca **8**: 53–55.
- Klingenberg, C. P. 1996. Multivariate allometry. In Advances in morphometrics. Proceedings of the 1993 NATO ASI on Morphometrics. L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, and D. Slice (eds.). Plenum Press, New York, New York, p. 23–49.
- Macchioni, G. 1968. Segnalazione di nuovi molluschi ospiti intermedi di *Brachylaima fuscata* (Rudolphi, 1819). Società Italiana delle Scienze Veterinarie **22**: 746–749.
- Macchioni, G. 1970. Variazioni intraspecifiche di *Brachylaema fuscata* (Rudolphi, 1819). Caratteri Tassonomicamente validi per la diagnosi di specie. Acta Medica Veterinaria (Napoli) **16**: 45–71.
- Madsen, H., T. D. Bui, T. T. Dang, K. V. Nguyen, A. Dalsgaard, and T. V. Phan. 2015. The role of rice fields, fish ponds and water canals for transmission of fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture ponds in Nam Dinh province, Vietnam. Parasites & Vectors **8**: 625.
- Mas-Coma, S., and J. Gállego. 1975. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. I. Parásitos de *Sorex* spp. (Insectivora: Soricidae). Revista Ibérica de Parasitología **35**: 262–276.
- Mas-Coma, S. 1977. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. II Parásitos de *Neomys fodiens* Pennant, 1771 (Insectivora, Soricidae). Revista Ibérica de Parasitología **37**: 227–242.
- Mas-Coma, S., and C. Feliu. 1977. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. IV. Parásitos de *Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Muridae). Revista Ibérica de Parasitología **37**: 301.
- Mas-Coma, S., and I. Montoliu. 1986. The life cycle of *Brachylaima ruminae* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rodents. Parasitology Research **72**: 739–753.
- Mas-Coma, S., I. Montoliu, and M. A. Valero. 1984. Méthodologie d'étude morphométrique de la variabilité intraspécifique chez les Digènes de la famille Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930. Bulletin de la Société Neuchâtoise des Sciences Naturelles **107**: 185–195.
- Mas-Coma, S., M. Gracenea, I. Montoliu, and M. D. Bargues. 1987a. Características cronobiológicas de la emisión de cercarias de especies de Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea). In Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario, Mamíferos y Helmintos. V. Sans-Coma, S. Mas-Coma, and J. Gosálbez (eds.). Ketres Editora S.A., Barcelona, Spain, p. 319–329.
- Mas-Coma, S., M. D. Bargues, M. Gracenea, and I. Montoliu. 1987b. Las estrategias etoecológicas generales y específicas en el ciclo biológico de los Digénidos Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea) y el concepto de selección r/K. In Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario, Mamíferos y Helmintos. V. Sans-Coma, S. Mas-Coma, and J. Gosálbez (eds.). Ketres Editora S.A., Barcelona, Spain, p. 253–317.
- Mas-Coma, S., M. D. Bargues and M. Gracenea, 1987c. La dinámica de la producción cercariana en digénidos Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea): hipótesis de funcionamiento. In Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario, Mamíferos y Helmintos. V. Sans-Coma, S. Mas-Coma, and J. Gosálbez (eds.). Ketres Editora S.A., Barcelona, Spain, p. 331–338.
- Mas-Coma, S., M. A. Valero, and M. D. Bargues. 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. Veterinary Parasitology **163**: 264–280.
- Meerburg, B. G., G. R. Singleton, and A. Kijlstra. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. Critical Reviews in Microbiology **35**: 221–270.
- Nordisiek, R. 2006. Systematics and *Cornu* problem. International Gastropod Society Newsletter. <http://amobrosi.tripod.com/snails/igs.html#robert>. Accessed 18th January 2017.
- Pojmanska, T. 2002. Family Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930. In Keys to the Trematoda. Vol. 1. D. I. Gibson, A. Jones, and R. A. Bray (eds.). CABI Publishing and The Natural History Museum, London, U.K., 521 p.
- Porcel, D., J. D. Bueno, and A. Almendros. 1996. Alterations in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata) after prolonged starvation. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology **115**: 11–17.
- Poulin, R. 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. Parasitology **132**: 143–151.
- Robertson, L. J., H. Sprong, Y. R. Ortega, J. W. B. van der Giessen, and R. Fayer. 2014. Impacts of globalisation on foodborne parasites. Trends in Parasitology **30**: 37–52.
- Roca, V., E. López-Balaguer, and M. J. Hornero. 1989. Helmintofauna de *Podarcis hispanica* (Steindachner, 1870) y *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) (Reptilia: Lacertidae). Revista Española de Herpetología **49**: 127–135.
- Roca, V., and M. J. Hornero. 1991. Helmintofauna de *Podarcis pityusensis* (Bosca, 1883) (Sauria: Lacertidae). Revista Española de Herpetología **5**: 77–87.
- Rohlf, F. J., and L. F. Marcus. 1993. A revolution morphometrics. Trends in Ecology and Evolution **8**: 129–132.
- Schell, S. C. 1985. Trematodes of North America, 1st ed. University Press of Idaho, U.S., 263 p.
- Segade P., J. García-Estévez, C. Arias, and R. Iglesias. 2013. Parasitic infections in mixed system-based helioculture farms: dynamics and key epidemiological factors. Parasitology **140**: 482–497.
- Segade, P., C. Crespo, N. García, J. M. García-Estévez, C. Arias, and R. Iglesias. 2011. *Brachylaima aspersae* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) infecting farmed snails in NW

- Spain: Morphology, life cycle, pathology, and implications for helioculture. *Veterinary Parasitology* **175**: 273–286.
- Segovia, J. M., J. Miquel, and J. Torres. 2000. Digenetic trematodes in wild canids from the Iberian Peninsula. *Acta Parasitologica Polonica* **45**: 164.
- Simon-Vicente, F. 1955. *Brachylaemus* en infestación experimental y natural. *Revista Ibérica de Parasitología* **15**: 301–319.
- Soo, O. Y. M., and L. H. S. Lim. 2015. A description of two new species of *Ligophorus* Euzet & Suriano 1G977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from Malaysian mugilid fish using principal component analysis and numerical taxonomy. *Journal of Helminthology* **89**: 131–149.
- Sospedra, E. 2000. Sobre las vermifaunas de las especies del género *Martes* Pinel, 1792 (Carnivora: Mustelidae) en España Continental e Insular. Dissertation. University of Barcelona, Barcelona, Spain, 353 p.
- Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment. 2016. Snail sector information. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/helicicola/informacion-del-sector/> Accessed 24th November 2016.
- Spratt, D. M. 2005. Australian ecosystems, capricious food chains and parasitic consequences for people. *International Journal for Parasitology* **35**: 717–724.
- Sukhdeo, M. V. K. 2012. Where are the parasites in food webs? *Parasites & Vectors* **5**: 239.
- Torres, J., J. Miquel, and M. Montje. 2001. Helminth parasites of the eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: A biogeographic approach. *Parasitology Research* **87**: 259–263.
- Trenberth, K. E. 2011. Changes in precipitation with climate change. *Climate Research* **47**: 123–138.
- United Nations. 2014. COMTRADE database DESA/UNSD. <http://comtrade.un.org/>. Accessed 12th December 2017.
- Valero M. A. 1986. Revisión sistemática de la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley 1930 (Trematoda: Digenea: Brachylaimoidea) con aportaciones al conocimiento de la variabilidad intraespecífica de los adultos de sus especies representativas. Dissertation. University of Valencia, Valencia, Spain, 908 p.
- Walz, Y., M. Wegmann, S. Dech, G. Raso, and J. Utzinger. 2015. Risk profiling of schistosomiasis using remote sensing: approaches, challenges and outlook. *Parasites & Vectors* **8**: 163.
- Williams, C. B. 1937. The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems. *Annals of Applied Biology* **24**: 404–414.
- Wittemberg, G. 1925. Versuch einer Monographie de Trematoden-Unterfamilie Harmostominae Braun. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere* **51**: 154–167.
- Yamaguti, S. 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vol. I. Keigaku Pub. Co., Tokyo, Japan, 1074 p.
- Yamaguti, S. 1975. A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates. Vol. II. Keigaku Pub. Co., Tokyo, Japan, 590 p.
- Zbikowska, E. 1998. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Biological Bulletin of Poznań* **35**: 25–32.
- Zelmer, D. 2013. Estimating prevalence: A confidence game. *Journal of Parasitology* **99**: 386–389.

3.2. Publicación #2: Terrestrial edible land snails as vectors for geographic dissemination of *Brachylaima* species

La detección de metacercarias *Brachylaima* en caracoles *C. aspersum* procedentes de mercados públicos y destinados a consumo humano, se complementa, en el presente trabajo, con el análisis de especímenes importados procedentes de Argelia y Sudáfrica, con el objetivo de valorar su contribución a la dispersión geográfica de especies pertenecientes al género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843. Se determina su prevalencia de parasitación por metacercarias *Brachylaima* spp. y se obtienen adultos *Brachylaima* experimentales para conseguir una aproximación a su adscripción específica mediante la realización de un análisis morfométrico comparativo con adultos y metacercarias *B. mascomai* y *B. llobregatensis*.

Se utilizó el test MANOVA para determinar los efectos univariantes y las diferencias por pares y el Análisis de Componentes Principales (PCA) para evaluar la contribución de cada variable a la separación de distintos grupos. Se obtuvieron los valores de 16 variables morfométricas en el caso de las metacercarias y 18 en el de los adultos. El test MANOVA aplicado a los datos morfométricos correspondientes a *B. mascomai*, *B. llobregatensis*, y a los adultos experimentales obtenidos a partir de metacercarias procedentes de Argelia y Sudáfrica mostró un efecto principal multivariante significativo ($p < 0.001$) y efectos univariantes en 13 variables ($p \leq 0.001$). Las comparaciones por pares mostraron diferencias significativas en 13 variables entre *B. mascomai* y los adultos experimentales argelinos. En cambio, cuando se compararon con *B. llobregatensis* sólo se encontraron diferencias significativas en tres variables (anchura del testículo I, anchura del testículo II y anchura del huevo). Los adultos experimentales sudafricanos mostraron diferencias significativas en 5 variables (longitud del cuerpo, longitud de la ventosa oral, anchura de la ventosa oral, longitud del huevo y anchura del huevo) cuando se compararon con *B. llobregatensis*, en cambio, cuando se compararon con *B. mascomai* sólo se encontraron diferencias significativas en una variable (anchura del testículo II). Los resultados del PCA mostraron dos grupos claramente diferenciados *B. llobregatensis*/Adultos experimentales argelinos (solapados) y *B. mascomai*/adultos experimentales sudafricanos (solapados).

La importación de especímenes de *C. aspersum* para consumo humano puede contribuir de forma significativa a la dispersión geográfica de las especies *Brachylaima* albergantes de metacercarias infestantes, las cuales pueden parasitar fácilmente animales dado su carácter heteroxeno. Hasta este momento sólo se había detectado *B. llobregatensis* parasitando *C. aspersum* del NE de España. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo cabe pensar

Resultados

que puede parasitar a *C. aspersum* en Argelia (Norte de África). Esta dispersión geográfica está favorecida por el comercio de caracoles terrestres como es el caso de *C. aspersum*.

Terrestrial Edible Land Snails as Vectors for Geographic Dissemination of *Brachylaima* Species

L. Gállego, O. González-Moreno, and M. Gracenea, Laboratory of Parasitology, Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Correspondence should be sent to: gracenea@ub.edu

ABSTRACT: *Cornu aspersum* (= syn. *Helix aspersa*) snails imported into NE Spain from Algeria and South Africa, and intended for human consumption via sale in public markets, were analyzed to assess their contribution to geographic dissemination of *Brachylaima* species. Prevalence and viability studies of metacercariae were performed on Algerian and South African *Brachylaima* adults. Morphometric studies were performed by measuring 16 variables in metacercariae and 18 variables in adults. Principal component analyses (PCA) were performed to assess the contribution of each variable in the separation of the different groups. A MANOVA test performed on morphometric data from *Brachylaima llobregatensis* and *Brachylaima mascomai* Algerian and South African adults, revealed a significant multivariate main effect ($P < 0.001$) and univariate effects in 13 variables ($P \leq 0.001$). Pairwise comparisons revealed significant differences in 13 variables between *B. mascomai* and Algerian adults, as opposed to 3 variables (testis I width, testis II width, and egg width) when compared with *B. llobregatensis*. South African adults had significant differences in 5 variables (body length, oral sucker length, oral sucker width, egg length, and egg width) when compared with *B. llobregatensis*, as opposed to 1 variable (testis II width) when compared with *B. mascomai*. Results from PCA showed 2 different groups: *B. llobregatensis*/Algerian adults (overlapped) and *B. mascomai*/South African adults (overlapped). Imported edible *C. aspersum* specimens can contribute significantly to the geographic spread of *Brachylaima* species by harboring infective metacercariae which could easily infect animals, given their heteroxenous character. *Brachylaima llobregatensis* has previously been detected in NE Spain only, and now this species appears to be parasitizing *C. aspersum* in Algeria (North Africa). This geographic dispersion could be favored by commerce in terrestrial snails such as *C. aspersum*.

Terrestrial helioid snails are the first and second intermediate hosts in the biological cycle of *Brachylaima* species in NE Spain and are parasitized by sporocysts and metacercariae, respectively (González-Moreno et al., 1994). *Brachylaima* spp. metacercariae are infective for mammals (humans included) and birds, which become parasitized by ingesting infected snails. Several cases of human infection by adult *Brachylaima* sp. trematodes have been reported in Australia (Butcher et al., 1996; Butcher, 1998; Butcher and Grove, 2001). This study describes how snails imported into Spain and intended for human consumption might contribute to the geographic dissemination of *Brachylaima* species.

Live specimens of *Cornu aspersum* (= syn. *Helix aspersa*) (Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) imported into Spain for human consumption were obtained through the Spanish Association for Breeding and Rearing Snails (ANCEC; Asociación Nacional de Cría y Engorde del Caracol) from lots coming from Algeria and South Africa, ready for distribution in marketplaces in NE Spain. Taking into account that identification of *Brachylaima* spp. generally requires the determination of the adult stage (Mas-Coma and Montoliu, 1986), and that it is necessary to check the viability of metacercariae parasitizing the snail, experimental *Brachylaima* adults were obtained in order to compare them with the most-frequently detected *Brachylaima* spp. in the area of Catalonia, NE Spain:

Brachylaima mascomai and *Brachylaima llobregatensis* (Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006).

Laboratory reared mice were infected with natural metacercariae from Algerian and South African *C. aspersum*, as described by Gracenea and González-Moreno (2002), and experimental Algerian and South African *Brachylaima* adults (15–19 days old) were obtained. Experimental *B. mascomai* and *B. llobregatensis* adults were obtained from experimental metacercariae parasitizing *C. aspersum* and *Otala punctata* (Müller, 1774), respectively, as indicated in Gracenea and González-Moreno (2002) and González-Moreno and Gracenea (2006). Natural and experimental metacercariae and experimental adults were fixed in Bouin's fluid under light coverslip pressure, stained with Grenacher's borax carmine, and mounted in Canada balsam.

Morphometric measurements are useful tools for comparing *Brachylaima* metacercariae and adults, although this only applies when equivalent-age adults are compared (Cribb, 1990). Recently, Alda et al. (2013) elucidated a new *Maritrema* spp. through morphometric characterization and statistical analyses such as Student's *t*-test and multivariate discriminants. Valero et al. (2012) used size-free canonical discriminant analysis to assess morphometric variation between samples of *Fasciola hepatica* from different geographical areas (Cajamarca, Peru; Mantaro, Peru; N Altiplano, Bolivia; Valencia, Spain; and Białowieza, Poland). Hahn et al. (2011) used principal component analysis (PCA) to re-describe morphometrics and distinguish *Gyrodactylus teuchis* from *Gyrodactylus salaris* (pathogen). Hanelt and Janovy (2002) used PCA and multivariate analysis of variance (MANOVA) to morphometrically distinguish non-adult stages of *Gordius robustus*, *Paragordius varius*, and *Chordodes morgani*. In the present work, a MANOVA test was used to compare the morphometrics of the species, and univariate effects were assessed and pairwise differences were studied with post-hoc Tukey and T3 Dunnett according to Levene test results. To assess the contribution of each variable in the separation of the different groups, the PCA was performed (Rohlf and Marcus, 1993; Klingenberg, 1996). Statistical analyses were conducted using SPSS v.20 for PC (IBM Corporation, Armonk, New York).

Measurements (in micrometers [μm]) were obtained by following the Mas-Coma et al. (1984) methodology with a Leica DM 1000 microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) using a calibrated ocular micrometer. Sixteen metric variables were obtained from metacercariae and 18 from adults. Seventeen experimental Algerian and South African adults (15–19 days old) were compared with 25 experimental adults of *B. mascomai* and *B. llobregatensis* (15–19 days old). Metric data from 8 natural Algerian and South African *Brachylaima* metacercariae were compared with 64 experimental metacercariae of *B. mascomai* and *B. llobregatensis*.

Two lots of *C. aspersum* from Algeria were analyzed for *Brachylaima* metacercariae (Lot 1: analyzed specimens 50, positive 26, number of metacercariae 170, prevalence 52%; Lot 2: prevalence 0%) and 1 lot from South Africa (analyzed specimens 55, positive 5, number of metacercariae 26, prevalence 9.1%).

Descriptive statistics of 4 species based on the adult morphometrics are presented in Table I. The MANOVA test performed on morphometric data from *B. llobregatensis*, *B. mascomai*, Algerian adults, and South African adults revealed a significant multivariate main effect, Wilks' lambda (λ) = 0.004, $F_{54,63.388} = 6.090$, $P < 0.001$, partial eta squared = 0.836. Power to detect the effect was 1.000. Significant univariate main

DOI: 10.1645/13-386.1

TABLE I. Descriptive statistics for experimental adults of *Brachylaima mascomai*, *Brachylaima ilobregatensis*, Algerian *Brachylaima* adults, and South African *Brachylaima* adults. SD: standard deviation; CV: coefficient of variation; n: number of specimens observed; BL: body length; BW: body width; OSL: oral sucker length; OSW: oral sucker width; VSL: ventral sucker length; VSW: ventral sucker width; PhL: pharynx length; PhW: pharynx width; TelL: testis I length; TelW: testis I width; TelII: testis II length; TelIW: testis II width; OvL: ovary length; OvW: ovary width; EggL: egg length; EggW: egg width; OS-VS: distance between OS and VS; VS-Tel: distance between VS and Tel. All measurements are in micrometers (µm).

Variables	<i>Brachylaima mascomai</i>						<i>Brachylaima ilobregatensis</i>						South African <i>Brachylaima</i> adults					
	Mean ± SD	Range	CV	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	Range	CV	n	Mean ± SD	Range	CV	n	Mean ± SD	Range	CV	n
BL	4.185.7 ± 644.6	(3.006.0-5.223.0)	0.15	17	2.387.5 ± 180.7	(2.206.8-2.568.1)	0.08	8	2.434.2 ± 372.5	(2.061.7-2.806.7)	0.15	15	4.497.2 ± 198.2	(4.299.0-4.695.4)	0.04	2		
BW	645.7 ± 62.7	(535.0-752.0)	0.10	17	624.3 ± 36.3	(588.0-660.5)	0.06	8	592.8 ± 67.7	(525.1-660.6)	0.11	15	598.8 ± 54.1	(544.7-652.8)	0.09	2		
OSL	271.2 ± 19.8	(241.0-309.0)	0.07	17	236.0 ± 16.0	(220.0-252.0)	0.07	8	236.6 ± 28.6	(208.0-265.3)	0.12	15	284.8 ± 0.0	(284.8-284.8)	0.00	2		
OSW	253.5 ± 18.4	(229.0-301.0)	0.07	17	204.8 ± 16.1	(188.7-220.9)	0.08	8	223.1 ± 27.3	(195.8-250.4)	0.12	15	274.6 ± 0.0	(274.6-274.6)	0.00	2		
VSL	271.7 ± 35.7	(150.0-313.0)	0.13	17	223.2 ± 19.4	(203.8-242.5)	0.09	8	243.4 ± 18.6	(224.8-262.0)	0.08	15	274.6 ± 28.8	(245.8-303.4)	0.10	2		
VSW	252.2 ± 32.1	(150.0-285.4)	0.13	17	215.6 ± 21.6	(194.0-237.2)	0.10	8	233.2 ± 28.1	(205.1-261.3)	0.12	15	264.4 ± 14.4	(250.0-278.8)	0.05	2		
PhL	123.8 ± 11.0	(100.0-144.7)	0.09	17	132.6 ± 44.0	(88.6-176.6)	0.33	8	127.5 ± 8.5	(119.0-135.9)	0.07	15	127.1 ± 7.2	(119.9-134.3)	0.06	2		
PhW	163.4 ± 12.9	(137.5-193.0)	0.08	17	171.9 ± 27.2	(144.7-199.0)	0.16	8	160.7 ± 8.8	(151.9-169.5)	0.05	15	172.9 ± 0.0	(172.9-172.9)	0.00	2		
TelL	442.6 ± 50.8	(365.8-539.0)	0.11	17	258.7 ± 61.8	(196.9-320.5)	0.24	8	217.4 ± 64.5	(152.9-281.9)	0.30	15	345.8 ± 43.1	(302.6-388.9)	0.12	2		
TelW	371.9 ± 48.5	(245.0-447.5)	0.13	17	228.7 ± 37.9	(190.8-266.6)	0.17	8	167.7 ± 59.7	(108.1-227.4)	0.36	15	274.6 ± 28.8	(245.8-303.4)	0.10	2		
TelII	510.6 ± 108.3	(365.8-711.9)	0.21	17	301.5 ± 33.3	(268.2-334.8)	0.11	8	232.6 ± 65.4	(167.2-298.0)	0.28	15	356.0 ± 71.9	(284.0-427.9)	0.20	2		
TelIW	391.7 ± 59.7	(289.4-518.7)	0.15	17	264.8 ± 26.2	(238.6-291.0)	0.10	8	159.2 ± 53.4	(105.8-212.5)	0.34	15	249.2 ± 50.3	(198.8-299.5)	0.20	2		
OvL	250.5 ± 39.8	(136.7-305.1)	0.16	17	192.0 ± 12.1	(179.9-204.1)	0.06	8	152.0 ± 36.0	(116.0-188.0)	0.24	15	249.2 ± 50.3	(198.8-299.5)	0.20	2		
OvW	210.9 ± 43.2	(88.4-261.3)	0.20	17	125.1 ± 22.4	(102.8-147.5)	0.18	8	108.0 ± 29.0	(79.0-137.0)	0.27	15	157.6 ± 7.2	(150.4-164.8)	0.05	2		
EggL	26.4 ± 0.8	(25.0-27.5)	0.03	17	30.9 ± 1.4	(29.5-32.3)	0.04	8	30.9 ± 1.2	(29.7-32.0)	0.04	15	24.7 ± 0.2	(24.4-24.9)	0.01	2		
EggW	14.8 ± 1.1	(12.5-17.6)	0.07	17	18.1 ± 0.7	(17.3-18.8)	0.04	8	16.7 ± 1.2	(15.5-17.9)	0.07	15	13.9 ± 1.2	(12.7-15.0)	0.08	2		
OS-VS	507.2 ± 143.8	(289.4-764.4)	0.28	17	563.6 ± 79.8	(483.8-643.5)	0.14	8	556.6 ± 99.2	(457.4-655.9)	0.18	15	696.6 ± 151.0	(545.6-847.7)	0.22	2		
VS-Tel	1.772.3 ± 408.2	(722.07-2.117.0)	0.23	17	686.9 ± 86.6	(600.3-773.5)	0.13	8	662.4 ± 144.3	(518.2-806.7)	0.22	15	2.025.7 ± 162.2	(1.863.5-2.187.8)	0.08	2		

TABLE II. Univariate effects in MANOVA test on adult stage (Wilks' $\lambda = 0.004$, $F_{(34,63.388)} = 6.090$, $P < 0.001$, partial eta squared = 0.836, power = 1.000) and significant pairwise differences (sa: South African *Brachylaima* adults, al: Algerian *Brachylaima* adults, †: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$). BL: body length; OSL: oral sucker length; OSW: oral sucker width; VSL: ventral sucker length; TeIL: testis I length; TeIW: testis I width; TeIIL: testis II length; TeIIW: testis II width; OvL: ovary length; OvW: ovary width; EggL: egg length; EggW: egg width; VS-Tel: distance between VS and Tel.

Variables	Significance level	Partial eta square	Power	<i>Brachylaima llobregatensis</i>	<i>Brachylaima mascomai</i>
BL	$F_{(3,38)} = 48.493$; $P < 0.001$	0.793	1.000	sa*	al†
OSL	$F_{(3,38)} = 9.087$; $P < 0.001$	0.418	0.992	sa*	al†
OSW	$F_{(3,38)} = 13.134$; $P < 0.001$	0.509	1.000	sa†	al†
VSL	$F_{(3,38)} = 6.783$; $P = 0.001$	0.349	0.962		al*
TeIL	$F_{(3,38)} = 43.939$; $P < 0.001$	0.776	1.000		al†
TeIW	$F_{(3,38)} = 44.687$; $P < 0.001$	0.779	1.000	al*	al†
TeIIL	$F_{(3,38)} = 31.885$; $P < 0.001$	0.716	1.000		al†
TeIIW	$F_{(3,38)} = 52.844$; $P < 0.001$	0.807	1.000	al*	al†, sa†
OvL	$F_{(3,38)} = 22.216$; $P < 0.001$	0.637	1.000		al†
OvW	$F_{(3,38)} = 26.173$; $P < 0.001$	0.674	1.000		al†
EggL	$F_{(3,38)} = 67.792$; $P < 0.001$	0.843	1.000	sa†	al†
EggW	$F_{(3,38)} = 22.522$; $P < 0.001$	0.640	1.000	al*, sa†	al†
VS-Tel	$F_{(3,38)} = 55.732$; $P < 0.001$	0.815	1.000		al†

effects were found for body length, oral sucker length, oral sucker width, ventral sucker length, testis I length, testis I width, testis II length, testis II width, ovary length, ovary width, egg length, egg width, and ventral sucker-testis I distance with $P \leq 0.001$ (Table II). Pairwise comparisons were studied with post-hoc Tukey in overall distance and T3 Dunnett correction for body length, pharynx length, testis II length, and ventral sucker-testis I distance. Algerian adults had significant differences when compared with *B. mascomai* in 13 variables of the 18 and only in 3 variables when compared with *B. llobregatensis*. South African adults had significant differences in 5 variables when compared with *B. llobregatensis* and only in 1 variable when compared with *B. mascomai*.

Adults of *B. llobregatensis* had testis I 27% wider than Algerian adults, testis II was 40% wider, and egg was 8% wider. In respect to South African adults, *B. llobregatensis* were 88% shorter, oral sucker was 21% shorter and 34% narrower, egg was 20% longer and 23% wider. *Brachylaima mascomai* adults were 42% longer than Algerian adults, oral sucker was 13% longer and 12% wider, ventral sucker 10% longer, testis I

51% longer and 55% wider, testis II 54% longer and 59% wider, ovary 39% longer and 49% wider, egg 17% shorter and 13% narrower, and the ventral sucker-testis I distance 63% longer. And, when compared to South African adults, *B. mascomai* testis II were 36% wider.

Results from PCA analysis showed that principal component 1 (PC1) (eigenvalue 9.497) accounted for the 52.76% of the variance. PC1 and PC2 (eigenvalue 2.014) explained 63.95% of variance and PC1-PC5 explained 85.19%. In PC1, variables with positive loading were body length (0.942), ventral sucker-testis I distance (0.930), testis I length (0.926), testis II length (0.904), and testis I width (0.901) and with negative loading were egg length (-0.849) and egg width (-0.706). The loadings of PC1 were mostly positive, confirming the relationship of this first component with size (Table III). In PC2, variables loading were pharynx width (0.900) and pharynx length (0.876). PC2-PC5 loadings were positive and negative, which are interpreted as reflecting shape.

A dispersion plot with PC1 and PC2 (Fig. 1) showed that adults of *B. llobregatensis* and Algerian experimental adults had an overlap, and both

TABLE III. Principal component analysis of correlation matrix of *Brachylaima* adults. BL: body length; BW: body width; OSL: oral sucker length; OSW: oral sucker width; VSL: ventral sucker length; VSW: ventral sucker width; PhL: pharynx length; PhW: pharynx width; TeIL: testis I length; TeIW: testis I width; TeIIL: testis II length; TeIIW: testis II width; OvL: ovary length; OvW: ovary width; EggL: egg length; EggW: egg width; OS-VS: distance between OS and VS; VS-Tel: distance between VS and Tel.

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
BL	0.942	0.087	-0.088	-0.092	0.034
BW	0.420	0.112	0.374	0.193	0.605
OSL	0.731	0.263	0.006	-0.405	0.092
OSW	0.678	0.298	-0.149	-0.477	-0.046
VSL	0.666	-0.046	-0.570	0.358	0.232
VSW	0.571	0.017	-0.618	0.367	0.311
PhL	-0.059	-0.876	-0.111	0.285	-0.215
PhW	0.071	0.900	0.138	0.247	-0.182
TeIL	0.926	-0.131	0.203	-0.009	0.035
TeIW	0.901	-0.064	0.313	0.098	0.055
TeIIL	0.904	-0.046	0.167	0.085	0.064
TeIIW	0.877	0.018	0.340	0.164	0.020
OvL	0.794	-0.075	0.247	0.177	-0.255
OvW	0.831	-0.190	0.191	0.175	-0.253
EggL	-0.849	0.061	0.160	0.203	0.189
EggW	-0.706	0.059	0.379	0.280	0.216
OS-VS	-0.039	0.428	0.093	-0.473	0.459
VS-Tel	0.930	0.019	-0.138	-0.063	-0.072

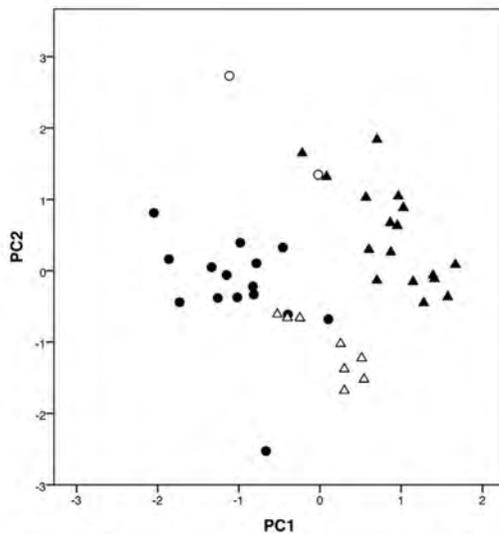


FIGURE 1. Principal component analysis dispersion plot. PC1 (principal component 1), PC2 (principal component 2). ● *Brachylaima* experimental adults obtained from natural Algerian metacercariae. △ Experimental adults of *Brachylaima llobregatensis*. ○ *Brachylaima* experimental adults obtained from natural South African metacercariae. ▲ Experimental adults of *Brachylaima mascomai*.

were completely separated from *B. mascomai* and South African specimens, which also showed overlap between them. These findings suggest that Algerian adults are very similar to *B. llobregatensis* spp. and South African adults to *B. mascomai* spp.

The MANOVA test revealed a significant multivariate main effect for *B. llobregatensis*, *B. mascomai*, and Algerian and South African metacercariae; Wilks' $\lambda = 0.222$, $F_{48,158,429} = 2.177$, $P < 0.001$, partial eta squared = 0.395. Power to detect the effect was 1.000. Given the significance of the overall test, the univariate main effects were examined. Significant univariate main effects for trematode group were obtained for testis II length, $F_{3,68} = 8.623$, $P < 0.001$, partial eta square = 0.276, power = 0.992; and testis II width, $F_{3,68} = 5.700$, $P < 0.002$, partial eta square = 0.201, power = 0.936. Significant group pairwise differences were obtained between *B. llobregatensis* and Algerian natural metacercariae in the body length ($P = 0.026$) and oral sucker–ventral sucker distance ($P = 0.032$), which were 33.44% and 11.55% shorter in *B. llobregatensis*, respectively, and between *B. mascomai* and Algerian natural metacercariae in the ventral sucker–testis I distance ($P = 0.002$), which was 19.24% longer in *B. mascomai*. No significant differences were found between *B. llobregatensis* metacercariae and South African natural metacercariae nor between *B. mascomai* and South African metacercariae.

PCA analyses showed that principal component 1 (PC1) accounted for 66.11% of the variation, PC2 for 9.13%, and PC3 for 7.53%; in total PC1–PC3 explained 82.77% of variability. PC1 had positive values for all variables showing its relationship with size, and PC2–PC3 had positive and negative values reflecting its relationship with shape (Table IV). The generated plot with PC1 and PC2 showed a complete overlapping of all trematode groups: *B. llobregatensis*, *B. mascomai*, Algerian natural metacercariae, and South African natural metacercariae.

Morphometric analyses identified 2 well-distinguishable groups at adult stage: *B. llobregatensis*/Algerian specimens and *B. mascomai*/South African specimens. Morphometric analyses have been used to differentiate

TABLE IV. Principal component analysis of correlation matrix of *Brachylaima* metacercariae. BL: body length; BW: body width; OSL: oral sucker length; OSW: oral sucker width; VSL: ventral sucker length; VSW: ventral sucker width; PhL: pharynx length; TeIL: testis I length; TeIW: testis I width; TeII: testis II length; TeIIW: testis II width; OvL: ovary length; OvW: ovary width; OS–VS: distance between OS and VS; VS–Tel: distance between VS and Tel.

Variable	PC1	PC2	PC3
BL	0.855	0.494	0.009
BW	0.774	−0.341	−0.256
OSL	0.898	−0.166	−0.050
OSW	0.896	−0.035	−0.244
VSL	0.898	−0.002	−0.303
VSW	0.861	0.144	−0.359
PhL	0.797	−0.083	−0.280
TeIL	0.879	−0.182	0.065
TeIW	0.915	−0.074	0.116
TeII	0.647	−0.376	0.551
TeIIW	0.779	−0.134	0.544
OvL	0.835	−0.243	0.048
OvW	0.811	0.021	0.023
OS–VS	0.672	0.473	0.220
VS–Tel	0.596	0.686	0.185

Maritrema oreense from *Maritrema bonaerense* (Alda et al., 2013), to elucidate 3 species of *Ligophorus* (*Ligophorus dominichi*, *Ligophorus pacificus*, and *Ligophorus cheleus*) (Rubtsova et al., 2007), and to characterize fasciolids from different geographical areas (Ashrafi et al., 2006).

It is clear that imported edible *Cornu aspersa* specimens could contribute significantly to the geographic spread of *Brachylaima* species harboring infective metacercariae, which could easily infect animals given their heteroxenous character (Yamaguti, 1975). *Brachylaima llobregatensis* has previously been detected in NE Spain only, and now this species appears to be parasitizing *Cornu aspersum* in Algeria (North Africa). The cycle of introduced *Brachylaima* species could develop in the receptor country, thereby spreading the infection to wildlife host species living in the new geographic zone. In such a scenario, it is important to remark that the cycle of *B. llobregatensis* involves the same species of snail, *C. aspersum*, as the first and second intermediate host (González-Moreno and Gracenea, 2006). So, cercariae released by a few first intermediate *C. aspersum* could easily infect large numbers of snails, which would become second intermediate hosts. Given that the snails are in close contact during transport, the trematode could even increase its prevalence in the transported snails. Both the intermediate hosts and the definitive ones (small mammals) of *B. llobregatensis* inhabit NE Spain (González-Moreno and Gracenea, 2006), South Africa (Canadian Food Inspection Agency, 2012), and Algeria (Guiller and Madec, 2010), so the cycle could settle in these countries.

Cornu aspersum is native to the Mediterranean area (Guiller et al., 2012). It comprises a set of north African endemic forms and subspecies that were described on the basis of shell characteristics. It has become abundant in all man-disturbed habitats in regions with a Mediterranean temperate and even sub-tropical climate and, to reconstruct its biogeographical history, variations in spatial patterns of shell, genital, and molecular characters were estimated in populations from western Mediterranean and European coastlines (Guiller et al., 1994; Madec and Guiller, 1994; Madec et al., 1996). Two anatomically and biochemically divergent groups of populations (West and East) resulted, between which the separation occurs in Kabylia (Algeria) and European populations clustering with western north African ones (Madec and Guiller, 1994; Madec et al., 2006). Spanish populations from the northeast coastline cluster with the western Algerian lineage, involving a northward

colonization of the western lineage that would have diverged from the eastern ancestral type. These data clearly fit with the geographical localization of *B. llobregatensis*, until now only reported from *C. aspersum* collected in nature in Catalanian specimens and from Algerian imported specimens.

Cribb (1990) argued that a form of *Brachylaima* recorded from *Mus domesticus* in South Australia, using introduced European snails in its cycle, had consequently been introduced from Europe and currently infects native Australian fauna. Other trematodes introduced into Australia from Europe are *Fasciola hepatica*, *Paramphistomum ichikawai*, *Calicophoron calicophorum*, and *Orthochoelium streptocoelium* (Boray et al., 1985). Also, the introduction of the New Zealand snail *Potamopyrgus antipodarum* to the United Kingdom allows the presence of *Notocotylus gippysensis* in that country (Bisset, 1977). Recently, the geographic dissemination of the giant African land snail *Achatina fulica* has contributed to the spread of *Angiostrongylus cantonensis* to the United States, where the parasite has been diagnosed in wildlife species (Kim et al., 2002), and to Australia (Prociv and Carlisle, 2001). In this context, the intercontinental flux of snails acting as first or second intermediate hosts of *Brachylaima* spp. really influences the geographical dissemination of the parasite. If, in addition, the snail is appreciated for its gastronomic value, as is *C. aspersum*, its importance as a vector of the parasite increases.

The authors thank ANCEC for its support in providing imported snails and gastropod maintenance.

LITERATURE CITED

- ALDA, P., N. BONEL, R. F. HECHINGER, and S. R. MARTORELLI. 2013. *Maritrema orensense* and *Maritrema bonaerense* (Digenea: Microphallidae): Descriptions, life cycles, and comparative morphometric analyses. *Journal of Parasitology* **99**: 218–228.
- ASHRAFI, K., M. A. VALERO, M. PANOVA, M. V. PERIAGO, J. MASSOUD, and S. MAS-COMA. 2006. Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitology International* **55**: 249–260.
- BISSET, S. A. 1977. *Notocotylus tadornae* n. sp. and *Notocotylus gippysensis* (Beverly-Burton, 1958) (Trematoda: Notocotylidae) from waterfowl in New Zealand: Morphology, life history and systematic relations. *Journal of Helminthology* **51**: 365–372.
- BORAY, J. C., G. C. FRASER, J. D. WILLIAMS, and J. M. WILSON. 1985. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Australian Veterinary Journal* **62**: 4–6.
- BUTCHER, A. R. 1998. First report of the isolation of an adult worm of the genus *Brachylaima* (Digenea: Brachylaimidae), from the gastrointestinal tract of a human. *International Journal for Parasitology* **28**: 607–610.
- , and D. I. GROVE. 2001. Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Systematic Parasitology* **49**: 211–221.
- , G. A. TALBOT, R. E. NORTON, M. D. KIRK, T. H. CRIBB, J. R. L. FORSYTH, B. KNIGHT, and A. S. CAMERON. 1996. Locally acquired *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) intestinal fluke infection in two South Australian infants. *Medical Journal of Australia* **164**: 475–478.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. 2012. *Helix aspersa* (European Brown Garden Snail). Fact Sheet. Available at: <http://www.inspection.gc.ca/plants/protection/nematodes-other/european-brown-garden-snail/fact-sheet/eng/1326334238293/1326341285764>. Accessed 31 August 2013.
- CRIBB, T. H. 1990. Introduction of a *Brachylaima* species (Digenea: Brachylaimidae) to Australia. *International Journal for Parasitology* **20**: 789–796.
- GONZALEZ-MORENO, O., and M. GRACENA. 2006. Life cycle and description of a new species of Brachylaimid (Trematoda: Digenea) in Spain. *Journal of Parasitology* **92**: 1305–1312.
- , I. MONTOLIU, and M. VILLA. 1994. Presencia de digénidos Brachylaimidae en el Delta del Llobregat (Barcelona): Estados larvarios parásitos de gasterópodos terrestres. *Iberus* **12**: 49–57.
- GRACENA, M., and O. GONZALEZ-MORENO. 2002. Life cycle of *Brachylaima mascomai* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rats in the Llobregat Delta (Spain). *Journal of Parasitology* **88**: 124–133.
- GUILLER, A., and L. MADEC. 2010. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: A new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 18. Available at: doi:10.1186/1471-2148-10-18. Accessed 24 July 2013.
- , and J. DAGUZAN. 1994. Geographical pattern of genetic differentiation in the landsnail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies* **60**: 205–221.
- , M.-C. MARTIN, C. HIRAUX, and L. MADEC. 2012. Tracing the invasion of the Mediterranean land snail *Cornu aspersum aspersum* becoming an agricultural and garden pest in areas recently introduced. *PLoS ONE* **7**: e49674. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0049674. Accessed 17 March 2014.
- HAHN, C., T. A. BAKKE, L. BACHMANN, S. WEISS, and P. D. HARRIS. 2011. Morphometric and molecular characterization of *Gyrodactylus teuchis* Lautraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vignelle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae) from an Austrian brown trout population. *Parasitology International* **60**: 480–487.
- HANELT, B., and J. JANOVY JR. 2002. Morphometric analysis of nonadult characters of common species of American gordiids (Nematomorpha: Gordiidae). *Journal of Parasitology* **88**: 557–562.
- KIM, D. Y., T. B. STEWART, R. W. BAUER, and M. MITCHELL. 2002. *Parastrongylus (Angiostrongylus) cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. *Journal of Parasitology* **88**: 1024–1026.
- KLINGENBERG, C. P. 1996. Multivariate allometry. In *Advances in morphometrics*. Proceedings of the 1993 NATO ASI on Morphometrics, L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, and D. Slice (eds.), Plenum Press, New York, New York, p. 23–49.
- MADEC, L., A. BELLIDO, A. COUTELLE, and A. GUILLER. 2006. Spatial genetic pattern in the land mollusc *Helix aspersa* inferred from a "center-based-clustering" procedure. *Genetics Research* **88**: 1–18.
- , and A. GUILLER. 1996. Statistical and biogeographical significances of patterns of morphological and biochemical variation in the land snail *Helix aspersa*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Series III* **319**: 225–229.
- , and A. GUILLER. 1994. Geographic variation of distal genitalia in the landsnail *Helix aspersa* (Mollusca:Gastropoda). *Journal of Zoology* **233**: 215–231.
- MAS-COMA, S., and I. MONTOLIU. 1986. The life cycle of *Brachylaima ruminae* n. sp. (Trematoda:Brachylaimidae), a parasite of rodents. *Parasitology Research* **72**: 739–753.
- , and M. A. VALERO. 1984. Méthodologie d'étude morphométrique de la variabilité intraspécifique chez les Digènes de la famille Brachylaimidae Joyaux et Foley, 1930. *Bulletin de la Societei Neuchâteloise des Sciences Naturelles* **107**: 185–195.
- PROCI, P., and M. S. CARLISLE. 2001. The spread of *Angiostrongylus cantonensis* in Australia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **32**(Suppl.): 126–128.
- ROHLF, F. J., and L. F. MARCUS. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 129–132.
- RUBTSOVA, N. Y., J. A. BALBUENA, and V. L. SARABEEV. 2007. Three new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) on the gills of *Mugil cephalus* (Teleostei: Mugilidae) from the Japan sea. *Journal of Parasitology* **93**: 772–780.
- VALERO, A., I. PEREZ-CRESPO, M. KHOUBBANE, P. ARTIGAS, M. PANOVA, P. ORTIZ, V. MACO, J. R. ESPINOZA, and S. MAS-COMA. 2012. *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: Valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution* **12**: 403–410.
- YAMAGUTI, S. 1975. A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Pub. Co., Tokyo, Japan, 590 p.

3.3. Publicación #3: Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae (Trematoda: Brachylaimidae) parasitizing the edible landsnail *Cornu aspersum* and its HPLC-MS/MS residue determination

El carácter cosmopolita del género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 y de *C. aspersum*, la ausencia de controles sanitarios en los caracoles de los mercados y la dispersión del parásito potenciada por el comercio internacional del caracol (aspectos en los que se ha profundizado en las publicaciones #1 y #2) incrementan el riesgo asociado a la braquilaimosis. En este contexto, la eliminación de la parasitación en los caracoles destinados a consumo humano mediante tratamiento farmacológico, constituye una herramienta de utilidad para la prevención de esta trematodosis. Se diseña un método de tratamiento adecuado para su aplicación en explotaciones helicícolas, de acuerdo con los estándares contemplados en los documentos guía emitidos por la “International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products” (VICH GL7) (VICH, 2000) a aplicar para la determinación de la eficacia de los antihelmínticos.

Este trabajo consta de dos partes: una primera centrada en los ensayos de **eficacia del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* spp. parasitando *C. aspersum*** (apartado 3.3.1) y una segunda parte enfocada a la **determinación del residuo de praziquantel** en la matriz biológica en la que se desarrolló y validó el método bioanalítico para ello (apartado 3.3.2).

3.3.1. Eficacia del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* spp. parasitando *Cornu aspersum*

Se diseñaron **dos ensayos de eficacia** según la normativa VICH GL7 (VICH, 2000): el primero de ellos fue el de **determinación de dosis** y el segundo el de **confirmación de dosis**. El test de determinación de dosis tiene como objetivo encontrar la dosis más adecuada en un rango que cumpla el criterio de eficacia VICH GL7 para registrar una nueva indicación, el cual corresponde a una reducción igual o superior al 90% en la carga parasitaria. La confirmación de dosis se realiza con la dosis que mejor resultado haya mostrado en el test de determinación de dosis, pero se ensaya con la formulación final y en condiciones más similares a las existentes en las explotaciones helicícolas.

Previamente a la descripción de los ensayos, cabe destacar algunos aspectos de interés:

Cálculo de eficacia: la normativa VICH GL7 recomienda el uso de medias geométricas para calcular la carga parasitaria. Tal y como se ha descrito en la publicación #1, debido a que los grupos de trabajo contienen ejemplares no parasitados, se utilizó la media

de Williams para acomodar estas parasitaciones nulas (valor cero). Así pues, la fórmula utilizada para el cálculo de la eficacia fue la siguiente:

$$\%Efficacy = \frac{(WM \text{ of metacercariae in CG} - WM \text{ of metacercariae in TG})}{WM \text{ of metacercariae in CG}} \times 100$$

Fórmula 1. Eficacia: reducción de la carga metacercarial. Media de Williams (WM). Grupo Control (CG). Grupo Tratamiento (TG).

Diferencias significativas en la carga metacercariana entre el grupo control y el tratamiento: para su evaluación se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney' (significancia $p \leq 0.05$), de utilidad en distribuciones no normales y en las que la comparación de medias no resulta adecuada (Rózsa y cols., 2000).

Criterio de inclusión: establecido para todos los ensayos, se emplean únicamente lotes de ejemplares cuya prevalencia de parasitación, comprobada previamente a los ensayos, ha de conducir a un límite inferior de los intervalos de confianza $\geq 60\%$. La fórmula a aplicar es la siguiente (Daniel, 2002; Zelmer, 2013):

$$p_{inferior}, p_{superior} = p \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

Formula 2 p =prevalencia; $Z_{(\alpha/2)}$ =1.96 para $\alpha=0.05$; $q=1-p$; n =número de especímenes analizados.

Ensayo de determinación de dosis

Se realizó de forma individual empleando tres grupos de 50 especímenes y aplicando a cada grupo una dosis de praziquantel de 1.2 mg, 1.8 mg y 2.4 mgPZQ/caracol, respectivamente. Cada caracol se dispuso individualmente en una caja de plástico con su dosis asignada en un soporte de plástico. El caracol ingiere el alimento adicionado con praziquantel y, una vez finalizado se analiza el ejemplar según los procedimientos descritos en la publicación #1. La eficacia para la dosis de 1.2 mg/caracol proporcionó una reducción del 64.8% ($p=0.001$) en la carga parasitaria, no cumpliendo con el criterio VICH GL7. Por el contrario, las dosis de 1.8 mgPZQ/caracol y 2.4 mgPZQ/caracol, sí cumplieron con el criterio VICH, proporcionando reducciones del 97.3% ($p<0.001$) y 98.7% ($p<0.001$) respectivamente, en la carga parasitaria de los ejemplares tratados, respecto a los grupos control.

En cuanto al **tiempo empleado por cada caracol en consumir la dosis asignada**, el 92% de los caracoles tratados con 1.2 mgPZQ/caracol empleó cuatro días, el 87% del grupo tratado con 1.8 mgPZQ/caracol empleó seis días y el 90% del grupo tratado con 2.4 mgPZQ/caracol, empleó el mismo tiempo.

Resultados

Ensayo de confirmación de dosis

La información obtenida en el ensayo de determinación de dosis permitió establecer la dosis óptima y la duración del tratamiento en el ensayo de confirmación. Se utilizaron doscientos ejemplares de *C. aspersum* divididos en grupo control (n=100) y grupo de tratamiento (n=100). Con el objetivo de aproximar, en lo posible, las condiciones del ensayo a las habituales en las explotaciones helicícolas, se emplearon grupos de 10 ejemplares en cada caja. Se dispuso diariamente 2 g de pienso adicionado con praziquantel (12 mgPZQ/g pienso) en cada caja y se admitió que todos los caracoles ingerirían la misma cantidad de alimento, calculada de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por las explotaciones helicícolas y que corresponde a una dosis de 2'4 mgPZQ/caracol. La duración del tratamiento se estableció en 7 días. La eficacia del praziquantel en este ensayo de dosis de confirmación resultó ser del 94'6% ($p<0.001$) en la reducción de la carga parasitaria, en tanto que la prevalencia de parasitación descendió del 68'7% al 10'1% (test de proporciones, $p<0.001$).

La cantidad de alimento consumida por los grupos control resultó significativamente diferente de la consumida por los grupos de tratamiento (ANOVA, $p<0.001$), si bien la eficacia no resultó afectada. Por el contrario, no se encontró diferencias significativas (ANOVA, post-hoc Tukey, $p=0.996$) en la cantidad de alimento consumida por caja dentro de los grupos control, ni tampoco en la consumida por caja en los grupos de tratamiento.

Para el cálculo de dosis en el ensayo de dosis de confirmación se utilizó la cantidad de praziquantel consumida (del día 3 al 7) y la media del peso de los caracoles con concha siendo la media de ingestión 220'2 mgPZQ/kg caracol, dosis que coincidió con el intervalo calculado para la administración de 150 mg de pienso suplementado con praziquantel (179'32-252'02 mg PZQ/kg caracol).

3.3.2. Determinación de praziquantel en la matriz biológica *Cornu aspersum*

Las condiciones del método, equipo e ionización están descritas en detalle en la información suplementaria de la publicación #3 (Appendix A: Supplementary Data, en el presente documento).

El método desarrollado reúne una serie de requisitos indicados por la EMA que son expuestos seguidamente.

Linealidad: La validación del método analítico incluyó la realización de rectas de calibración, cumpliendo requisitos específicos para los estándares, estableciéndose un rango de concentraciones de 0'05-6µg/ml. La amplitud del rango vino determinada por la ausencia de datos bibliográficos referentes a las concentraciones detectables en la matriz biológica gasterópodo empleada en el ensayo. El rango mostró un buen ajuste cuadrático si bien no cumplía los estándares exigidos por la EMA en las pruebas de exactitud. Se optó por validar dos rectas de calibración con regresión lineal con rangos 0'05-0'8 µg/ml (bajas concentraciones) y 0'8-6 µg/ml (altas concentraciones), siendo 0'05 µg/ml el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y 6 µg/ml el límite superior de cuantificación (ULOQ). Ambas rectas fueron evaluadas por triplicado obteniéndose los ajustes $r^2=0'999$, $r^2=0'999$, $r^2=0'999$, y $r^2=0'996$, $r^2=0'997$, $r^2=0'999$, respectivamente

La validación de las rectas de calibración requirió disponer previamente de doce soluciones estándar de praziquantel preparadas empleando un pool de extracto de matriz gasterópodo y metanol calidad HPLC, con concentración 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 y 6.0 µg/ml (praziquantel/pool).

Una vez obtenidos los valores de las áreas integradas de los ionogramas, procedentes del HPLC-MS/MS, para cada estándar se construyeron las rectas de calibrado y se calculó la concentración del estándar reintroduciendo el área de cada estándar en la recta. El valor obtenido no podía tener variaciones superiores al $\pm 15\%$ del valor nominal, a excepción del LLOQ al que se permitía una variación de hasta el $\pm 20\%$. Ambos rangos de rectas cumplieron con esta exigencia de la EMA, tanto en la validación como en los ulteriores análisis rutinarios de cuantificación.

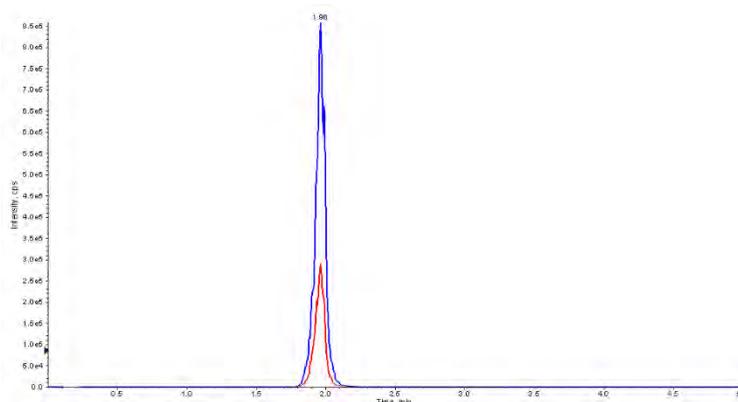


Figura 13. Ionograma del patrón 1 $\mu\text{gPZQ/ml}$. Adquisición “Multiple Reaction Monitoring” para las transiciones 302.2/203.3 y 313.2/83.2, con tiempo de permanencia 200 ms.

Selectividad: De acuerdo con la EMA, el área obtenida para muestras sin praziquantel (blancos) no puede superar el 20% del área obtenida para el estándar del LLOQ ($0.05 \mu\text{g/ml}$). Esta exigencia permite asegurar la ausencia de interferencias entre el analito, praziquantel, y las sustancias que conforman la matriz biológica de *C. aspersum*. Las áreas integradas correspondientes a *C. aspersum* se mantuvieron entre 624'817 y 10018'079, por debajo del 20% de la media de la señal obtenida en cinco replicados correspondientes al LLOQ (media 68391'686; DE: 308'096, $n=5$) (Figura 13).

Límite inferior de cuantificación: Se fijó en $0.05 \mu\text{g/ml}$ ya que fue la concentración más baja de analito que pudo ser cuantificada de forma fiable cumpliendo con los criterios de exactitud y precisión de la EMA quien exige que la señal del LLOQ debe ser por lo menos 5 veces la señal de un blanco. La media del área integrada del LLOQ fue cuarenta veces mayor que la media de los blancos. Teniendo en cuenta que la EMA permite como máximo una ingesta diaria de praziquantel (ADI) de 10mg/persona y suponiendo una ingesta diaria de 25 caracoles, la cantidad máxima de praziquantel permitida por caracol sería de 0.4 mg. Consecuentemente, el LLOQ de $0.05 \mu\text{g/ml}$ correspondería a detectar 5 $\mu\text{g PZQ/caracol}$, una cantidad 80 veces más pequeña que la cantidad máxima aceptada por lo que el método es capaz de cuantificar el praziquantel de acuerdo a la legislación vigente.

Carry Over: se define como la aparición de la señal del analito en un blanco después del análisis de muestras con una concentración de analito muy alta (EMA, 2011). En el caso del praziquantel, el carry over se evaluó intercalando el análisis de muestras muy concentradas (6 $\mu\text{g/ml}$, ULOQ) y muestras de blancos. Para demostrar la

ausencia de carry over en el método, la señal de cada muestra de blanco no podía superar el 20% de la señal del LLOQ y este límite fue conseguido (Tabla I).

Samples performed injections	Peak Area	ULOQ mean peak area (n=5)	Blank mean peak area (n=5)	LLOQ mean peak area (n=5)	20% of the LLOQ mean peak area
ULOQ standard	6733018.000	6614645.918	1863.175	75949.231	15189.846
Blank	1892.975	SD	SD	SD	
ULOQ standard	6548112.880	84860.292	81.238	1038.878	
Blank	1968.155				
ULOQ standard	6674934.270				
Blank	1858.648				
ULOQ standard	6573507.360				
Blank	1743.339				
ULOQ standard	6543657.080				
Blank	1852.756				

Tabla I. Carry over. Areas del pico de praziquantel correspondientes al ULOQ (límite superior de cuantificación) 6.0 µg/ml (praziquantel/matrix extract pool), matriz blanca, y LLOQ (límite inferior de cuantificación) 0.05 µg/ml (praziquantel/matrix extract pool).

Exactitud y precisión: La EMA exige que el valor medio de la concentración de cinco determinaciones practicadas sobre el mismo control se mantenga en $\pm 15\%$ del valor nominal, llegando a aceptar $\pm 20\%$ para el LLOQ, tanto para la exactitud intra como la inter-día. Fueron evaluados tres conjuntos de datos en tres días sucesivos con controles de concentraciones: 0'05, 0'08, 0'4, 0'6, 0'8, 1, 4 y 5 µg/ml con resultados óptimos. La precisión del método (expresada como % del coeficiente de variación) ha de mantenerse en el intervalo 15-20%, según la EMA y así resultó, siendo calculado para cinco muestras por cada concentración (tabla en la publicación #3).

Integridad de la dilución: Al tratarse de una matriz biológica (extracto de gasterópodo) y no de disolvente puro, es imprescindible comprobar que los componentes biológicos no tuvieran efectos sobre la dilución y, con ello, sobre la exactitud y precisión. Se evaluó mediante cinco determinaciones del control 0'8 µgPZQ/ml, diluyendo 1:10 con metanol un control 8 µgPZQ/ml matriz. Se mantuvo la exactitud y la precisión en los intervalos propuestos por la EMA.

Efecto de la matriz: El efecto de la matriz se evaluó calculando el factor de matriz (área del pico en presencia de la matriz/área del pico en metanol) para seis replicados de controles de concentración 0'08 y 5'0 µgPZQ/ml. Se cumplieron los requisitos de

Resultados

la EMA (%CV \leq 15) para cada nivel de concentración estudiado, siendo %CV = 10'86 y CV = 10'01, respectivamente.

Estabilidad: El estudio de estabildades se efectuó a corto plazo (24h a temperatura ambiente) y tras 24h, 1 mes y 3 meses en congelador a -20°C seguido de descongelación a temperatura ambiente. Se emplearon dos concentraciones, una próxima al LLOQ y otra al ULOQ, cumpliéndose los requisitos de la EMA (%CV \leq 15) para cada nivel de concentración estudiado (Tabla II).

	Praziquantel in matrix extract pool ($\mu\text{g/ml}$)							
	24 hours room temperature		24 hours frozen (-20°C) and thawing		1 month frozen (-20°C) and thawing		3 month frozen (-20°C) and thawing	
Nominal concentrations	0.08	5.0	0.08	5.0	0.08	5.0	0.08	5.0
Back-calculated concentrations	0.092	5.438	0.092	5.315	0.092	5.229	0.092	5.581

Tabla II. Estabilidad. Concentraciones “Back-calculated” (praziquantel/pool de extracto de matriz) dentro del \pm 15% del valor nominal.

3.3.3. Determinación en caracoles tratados

La determinación realizada en ejemplares utilizados como control fueron siempre negativos para praziquantel. En todos los caracoles que recibieron tratamiento (3 días *ad libitum*, 2 g de pienso de caracol suplementado con 11 mgPZQ/g por día) se detectó PZQ siendo los valores experimentales obtenidos (0.363 mg PZQ/caracol y 0.093 mg PZQ/caracol) el 10% del cálculo teórico de dosis (3.603 mg PZQ/caracol y 0.924 mg PZQ/caracol) y sugiriendo una eliminación defármaco. Unos resultados que coinciden con la eliminación del praziquantel en otros animales (EMA, 1996).



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Full length article

Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae (Trematoda: Brachylaimidae) parasitizing the edible landsnail *Cornu aspersum* and its HPLC-MS/MS residue determination



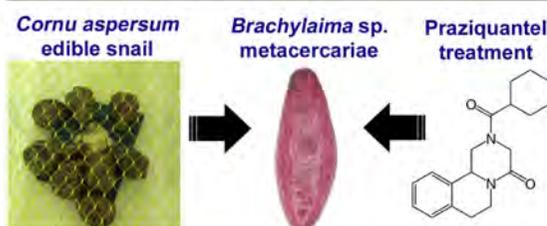
Laia Gállego, Mercedes Gracenea*

Laboratory of Parasitology, Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- Praziquantel reduces 95% the *Brachylaima* metacercarial burden in *Cornu aspersum*.
- A first approach to treat terrestrial snails following EU guidelines is reported.
- Praziquantel is well tolerated by *C. aspersum* through oral dose in snail food.
- A method to quantify praziquantel in gastropod matrix is set up (EMA criteria).

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2015
 Received in revised form
 19 June 2015
 Accepted 22 June 2015
 Available online 30 June 2015

Keywords:

Brachylaima
Cornu aspersum
 Praziquantel
 Efficacy
 HPLC-MS/MS
 Brachylaimiasis

ABSTRACT

Cornu aspersum is a terrestrial edible snail, often parasitized by *Brachylaima* (Trematoda) metacercariae. Ingestion of undercooked snails by humans allows metacercariae to develop to adult in the intestine causing brachylaimiasis (expected mortality rate 5–10%). The cosmopolitan character of the trematode and of its vector, enhanced in a future climate change scenario, and the absence of adequate sanitary controls of the snails in marketplaces clearly increase the risk of human brachylaimiasis. The treatment of farmed snails with praziquantel (PZQ) would be a tool to control this food-borne disease. The objectives of this study were: to report the prevalence of *Brachylaima* metacercariae parasitizing *C. aspersum* in marketplaces, to assess the efficacy and tolerance of PZQ in *C. aspersum* and to develop an HPLC-MS/MS analytical method to quantify PZQ residue in the edible snail (the acceptable daily intake of PZQ is 0.17 mg/kg bw in humans). Prevalence of parasitization of *C. aspersum* by *Brachylaima* metacercariae in public marketplaces reached the 80%. PZQ was orally administered to snails, mixed with the usual snail food. In dose determination assays three doses were individually tested (10 days): 1.2 mg PZQ/snail, 1.8 mg PZQ/snail (efficacy 97.3%, $p < 0.001$) and 2.4 mg PZQ/snail (efficacy 98.7%, $p < 0.001$). In dose confirmation tests ($n = 200$) the 2.4 mg PZQ/snail dose was group tested (10 snails/box, 7 days): 2 g of PZQ supplemented snail food were disposed daily in the treatment group boxes and 2 g of snail food (placebo) in the control boxes (efficacy 94.6%, $p < 0.001$; prevalence dropped from 68.7% in control group to 10.1% in treatment group, $p < 0.001$). Received dose was 220.2 mg PZQ/kg snail with shell. In the analytical method, linearity, lower limit of quantification (0.05 $\mu\text{g/ml}$), selectivity, carry over, accuracy, precision, dilution integrity, matrix effect and stability were tested. Sixty snails were treated (11 mg PZQ/

Abbreviations: ADI, acceptable daily intake; CI, confidence intervals; CV, coefficient of variation; CVMP, Committee for Veterinary Medicinal Products; EMA, European Medicines Agency; HPLC-MS/MS, High Performance Liquid Chromatography-Mass/Mass; LLOQ, lower limit of quantification; PZQ, praziquantel; SD, standard deviation; ULOQ, Upper Limit of Quantification; VICH, Veterinary International Conference on Harmonization.

* Corresponding author.

E-mail address: gracenea@ub.edu (M. Gracenea).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.013>
 0014-4894/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

g snail food) and analyzed. PZQ was detected and quantified (0.093 mg PZQ/g snail). PZQ treatment of *C. aspersum* is effective, well tolerated by the snail, affordable and easy to reproduce in snail farms.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cornu aspersum (= syn. *Helix aspersa*) (Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) is a terrestrial edible snail of commercial interest. *Brachylaima* (Trematoda: Brachylaimidae) metacercariae often parasitize the kidney of the gastropod in nature and marketplaces (Gracenea and González-Moreno, 2002; Gracenea et al., 2009), where prevalence can reach 85.4%. Brachylaimid species belong to three subfamilies, Brachylaminae, Ityogoniminae and Panopistinae (Mas Coma and Gallego, 1975), and they share the same three-host life cycle pattern including a terrestrial gastropod snail (Pulmonata: Stylommatophora) as first intermediate host, an additional molluscan individual, harboring metacercariae, belonging to another (or sometimes the same) terrestrial gastropod species as second intermediate host, and an endothermic vertebrate as definitive host (Mas Coma and Gallego, 1975; Yamaguti, 1975; Sirgel et al., 2012). Ingestion of undercooked second intermediate host snails by humans allows metacercariae to develop to adult in the intestine causing brachylaimiasis (Butcher et al., 1998, 1996). The main presenting symptoms are diarrhea (100%), abdominal pain (58%), anorexia (58%) and weight loss or poor weight gain (58%) due to the haematophagous nature of *Brachylaima* sp. intestinal adults (Butcher, 2006; Sirgel and Mas Coma, 2010). In Australia up to 13 cases have been diagnosed (Butcher, 2006; Butcher et al., 1998, 1996). Meerburg et al. (2009) classified brachylaimiasis as a pathology with an expected mortality rate in humans (without treatment) between 5 and 10% and claimed livestock and food products as one of the most important via to spreading this snail-borne diseases to human.

In some countries like Australia the snail ingestion is accidental, but in others like China, France, Spain, Italy, Romania etc., snails are the main component of traditional dishes from ancient times (Butcher et al., 1996; Fernández-López de Pablo et al., 2014; Lubell, 2004). In 2009 Spain consumed 10,942 tones of snails, in 2010, France consumed 22,000 tones, and Italy consumed 38,000 tones. In general, the worldwide consume of snails is about 450,000 tones/year (Istituto Internazionale di Elicicoltura Cherasco, 2015; Ministry of Agriculture, Nutrition and Environment Spanish Government, 2015; Prochile, 2011). Consequently, if the ingestion of snails is not accidental but usual, the risk of human parasitization and brachylaimiasis is increased. Nowadays, the difficulty of the clinical diagnosis because of the small size of the *Brachylaima* eggs (30–25 µm length), and the inespecific symptomatology of brachylaimiasis (Butcher et al., 2002, 1998, 1996; Cribb, 1990; González-Moreno and Gracenea, 2006; Gracenea and González-Moreno, 2002) make possible that many cases of brachylaimiasis could be underdiagnosed. *Brachylaima* metacercariae are cosmopolitan. This character is due, firstly to their scarce specificity respect to the second host, since a great diversity of terrestrial gastropod species has been reported parasitized by this trematode (Mas-Coma and Montoliu, 1986; Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006), and secondly, to the worldwide dispersion of their suitable vector *C. aspersum*, now present in many zones having Mediterranean, temperate and even subtropical climates, on the American and African continents, as well as on the Mascarene Islands, Oceania and Asia (Ansart et al., 2009), where, the snail can become a pest (Guiller et al., 2012).

This cosmopolitan character is, still more, enhanced by the international commerce of *C. aspersum*, since snails in wholesalers intended for public food markets in Spain, coming from Algeria and South Africa, presented *Brachylaima* sp. metacercariae (Gállego et al., 2014; United Nations, 2014). Climate change (IPCC, 2014, 2013) favors the invasive character of *C. aspersum* (Arnaud et al., 2003; Dahirel et al., 2013; Peltanová et al., 2012), since the thermal sensitivity of this molluscan invasive species fits with the “hotter is better” scenario (Gaitán-Espitia et al., 2013), where populations adapted to warmer temperatures showed higher optimal temperature and higher maximum performance than populations adapted to colder temperatures. So, this species originating from warm Mediterranean areas (Guiller and Madec, 2010), is well adapted to a warming climate change, which can improve its geographical dispersion and its presence in areas where now is absent (northern to Germany and Scotland for British Isles in Europe, for instance (Kerney and Cameron, 1979). So, the high prevalence of *Brachylaima* metacercariae in *C. aspersum* intended for human consumption in marketplaces, the previous detection of human cases of brachylaimiasis, the cosmopolitan character of the trematode and of its vector, enhanced in a future climate change scenario, and the absence of adequate sanitary controls of the snails clearly increases the risk of human brachylaimiasis, and this trematodiasis can become one of the most widespread food-borne parasitic disease, now neglected.

In this context, pharmacological treatment of farmed snails against *Brachylaima* metacercariae is a plausible way to control the brachylaimiasis. At the moment, neither marketplace snails nor farm snails are dewormed with a pharmacological treatment (Segade et al., 2011). For this purpose, praziquantel (PZQ) is the drug of choice, since its effectiveness has been repeatedly demonstrated in animals intended for human consumption (fish, goats, ovine species) (EMA, 1996; Johansen et al., 1996; Shirakashi et al., 2012) and against several trematodes like *Clonorchis sinensis* (Xiao et al., 2011), *Echinostoma paraensei* (Gonçalves et al., 2013) and *Schistosoma mansoni* (in this case parasitizing the snail *Biomphalaria glabrata*) (Mattos et al., 2007; Riley and Chappell, 1990). And its use in other trematodes like *Schistosoma japonicum*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani*, and *Neodiplostomum seoulense* has been recently reviewed (Chai, 2013). In this work, an adequate way to administrate PZQ to snails is explored. The most simple is to use the usual feeding system employed for growing the snails in the semi-intensive (indoor–outdoor) farming (Fig. 1) (Chevallier, 1985; Cooper and Knowler, 1991). Briefly, a farm area is delimited by fences and covered by a roof net preventing invasion by birds and other animals. Usually, snails rest on mesh pieces vertically disposed, supported by a metallic frame. The snail food is placed on a plastic feeding trough (40 cm length) located over the metallic frame. In the present study, PZQ is mixed with the usual snail food and it is placed on small plastic pieces disposed inside the box where the snails are maintained along the assays. Thus, the snails are treated via oral exactly in the same way that they are feed in farming. The European Medicines Agency (EMA) fixes the acceptable daily intake (ADI) of praziquantel in 0.17 mg/kg body weight (10 mg of praziquantel/person), by ingestion of food products obtained from animals that have received a veterinary medicine



Fig. 1. Feeding system in a growing snail farm. Snails rest on mesh pieces vertically disposed, supported by a metallic frame. The snail food is placed on a plastic feeding tray through located over the metallic frame (arrows).

(EMA, 1996). Consequently, if snails are treated with praziquantel, food safety has to be assured and the development of a bio-analytical method for the quantitative determination of praziquantel in the *C. aspersum* matrix is essential (EMA, 1998, 1996). HPLC-MS/MS is a powerful technique for the quantitative determination of drugs and metabolites in biological fluids and tissues, such as human plasma and urine (Jiang et al., 2012) or mouse plasma and tissue (Zhao, 2005). The HPLC technique has been used for the quantitative determination of praziquantel in fish plasma and tissue muscle (Kim et al., 2003, 2001), in human plasma (Hanpitakpong et al., 2004; Ridditid, 2002) or TC-199 buffer in the rat everted gut sac absorption model (Cinto et al., 2009). This technique is the basis of the analytical method proposed in this work. The objectives of this study are, to report the prevalence of *Brachylaima* metacercariae parasitizing *C. aspersum* in marketplaces, to assess the efficacy of praziquantel against *Brachylaima* sp. metacercariae, to test the tolerance of the snail, and to develop and apply a sensitive and selective method using the HPLC-MS/MS technique to quantify praziquantel in the gastropod matrix, following the EMA guidelines for bioanalytical methods (EMA, 2011).

2. Materials and methods

2.1. Drug and controlled efficacy tests

Praziquantel (PZQ) (L13080026, 101.0% pure) was obtained from Fagron Iberica, S.A.U. (Terrassa, Spain). Snail food was provided by the Spanish Association for Breeding and Rearing Snails (ANCEC, "Asociación Nacional de Cría y Engorde del Caracol").

Controlled efficacy tests (Dose Determination and Dose Confirmation) were performed following the VICH GL7 (Veterinary International Conference On Harmonization) guideline "Efficacy of Anthelmintics General Requirements" (VICH, 2000) adopted by the Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) of the European Union. According to VICH, Dose determination tests aim to find the most appropriate dose in a range. After, the best dose is submitted to Dose confirmation tests in order to assure its effectiveness in terms of efficacy.

2.2. Exploratory study *Brachylaima* metacercariae identification and prevalence in marketplace *Cornu aspersum*

Previously to perform the dose tests, an exploratory study was done in order to assess the prevalence of parasitization of marketplace snails by *Brachylaima* metacercariae. Fifty specimens were collected in six public marketplaces (A to F, Table 1) in Barcelona, Spain. All the specimens of *Cornu aspersum* employed in the trial met the morphological and morphometrical standard description for this species. The adult character of any snail was assured by the presence of a reflected lip at the shell aperture (Ansart and Vernon, 2004; Arrébola Burgos, 2002).

Prevalence of *Brachylaima* metacercariae and individual metacercarial burden were determined by kidney examination of the snails under a binocular stereomicroscope Leica MZ6, identifying and counting the metacercariae if present (González-Moreno and Gracenea, 2006; Gracenea and González-Moreno, 2002). *Brachylaima* metacercariae are free, unencysted within the kidney of the snail, and their morpho-anatomic characters clearly allow the identification of the larvae at genus level (Yamaguti, 1971, 1975; Mas-Coma and Montoliu, 1986; Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006; Segade et al., 2011) and their differentiation from other genus within the family Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1980. Discriminative characters as the position of the genital pore anterior to the anterior testis, caeca symmetrical, two testes present, gonads more or less in tandem, and vitellarium in the middle third of body, are key for their inclusion in the genus *Brachylaima* Dujardin, 1843 according with Pojmańska (2002) (Fig. 2).

The prevalence of *Brachylaima* metacercariae was calculated for each of the six marketplaces. Only the snails in which the inferior limit of the prevalence of parasitization by *Brachylaima* metacercariae was equal or greater than 60% (95 confidence intervals) (CI) (Daniel, 2002; Zelmer, 2013), were included in the following dose determination and dose confirmation assays. This condition was better accomplished by snails from marketplace A and D (Table 1) (68.9–91.09% prevalence). Thus, snails for the Dose determination and Dose confirmation tests were collected from marketplace A.

2.3. Dose determination tests

For Dose determination tests, three hundred snails were collected in marketplace A and divided in three lots (Lot 1, Lot 2, and Lot 3, $n = 100$ specimens each lot). These lots were employed, respectively, to perform three independent trials to test a preliminary range of three doses of PZQ: 1.2 mg PZQ/snail (100 mg of snail food supplemented with 12 mg PZQ/g snail food), 1.8 mg PZQ/snail (150 mg of 12 mg PZQ/g snail food) and 2.4 mg PZQ/snail (200 mg of 12 mg PZQ/g snail food).

For each tested dose, fifty snails (mean weight = 8.01 ± 1.84 g with shell) were used as treatment group and fifty as control group in each Lot. Snails were disposed individually in plastic boxes ($23 \text{ cm} \times 13 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$) covered with a net, maintained at room temperature (mean $21.3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.7$, relative humidity $33.9\% \pm 6.0$), under natural light–dark cycle, and sprayed with tap water twice in a day. Snail food mixed with PZQ was disposed on a small plastic plate ($8.5 \text{ cm} \times 7.0 \text{ cm}$) inside each box on the first day of trial in the treatment group. Food was weighted and controlled each 24 h along 10 days. Specimens were maintained in the boxes until the food was finished. When a snail finished the disposed food, the specimen was analyzed. Control snails were maintained in the same conditions.

The metacercariae collected from each analyzed snail were transferred to a Petri dish containing PZQ free snail media (NaCl

Table 1

Metacercarial burden and prevalence assessment in *C. aspersum* coming from six Barcelona public marketplaces (A to F). n = Number of specimens analyzed in each marketplace. CI=Confidence interval. SD=standard deviation.

Marketplaces	A (n = 50)	B (n = 50)	C (n = 50)	D (n = 50)	E (n = 57)	F (n = 50)
Metacercarial burden						
Range	0–20	0–80	0–30	0–28	0–25	0–10
Arithmetic Mean ± SD	2.74 ± 3.74	4.02 ± 11.67	3.22 ± 5.82	3.94 ± 5.61	2.79 ± 4.14	1.88 ± 2.36
Williams Mean	1.76	0.41	0.54	2.24	1.64	1.12
Prevalence assessment						
Prevalence %	80%	50%	62%	80%	71.93%	60.00%
Prevalence CI 95%	68.9%–91.1%	36.14%–63.86%	48.5%–75.45%	68.9%–91.1%	59.5%–84.4%	46.42%–73.58%

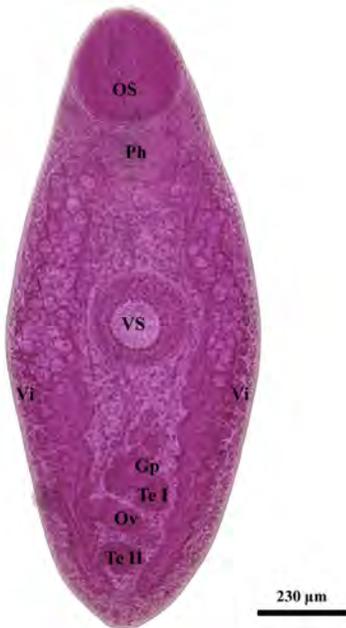


Fig. 2. *Brachylaima* sp. metacercariae stained with Grenacher's borax carmin and mounted in Canada balsam. Gp: Genital pore; OS: Oral sucker; Ov: Ovary; Ph: Pharynx; Te I: Testes I; Te II: Testes II; VS: Ventral sucker; Vi: Vitellaria.

5.7 g/l, KCl 0.5 g/l, CaCl₂ g/l) (Coppo, 2008) to test if they are dead or not. If after 30 min, no movement was observed under binocular stereomicroscope the metacercariae were considered dead (Pica-Mattoccia and Cioli, 2004). Thus, the prevalence (%) of parasitization of the treated snails and the individual and mean metacercarial burden were calculated for each tested dose. The best preliminary results were obtained with dose 2.4 mg PZQ/snail.

2.4. Dose confirmation tests

To confirm the efficacy of the best dose (2.4 mg PZQ/snail), two hundred *Cornu aspersum* specimens were collected also in marketplace A. The treatment group was formed by one hundred specimens and the control group included also one hundred snails. The treatment snails were disposed in 10 plastic boxes (23 cm × 13 cm × 8 cm, 10 specimens/box), and they were maintained under the same conditions than in the Dose determination tests (2.3). The control snails were managed under the same

conditions than the treated specimens.

Each day, 2 g of PZQ supplemented snail food (12 mg PZQ/g snail food) were disposed on a small plastic plate (8.5 cm × 7.0 cm) in each box of the treatment group (n = 100 specimens, 10 specimens/box = 10 replicates) and 2 g of snail food (placebo) in each box of the control group (n = 100 specimens, 10 specimens/box = 10 replicates). Snail food in control and treatment groups was weighted when disposed and daily food consumption was controlled per box and day. After finishing the trial (7 days), the prevalence of *Brachylaima* metacercariae in the control and treatment groups and the individual and mean metacercarial burden were calculated as described (2.3 Dose determination) (Fig. 3).

2.5. Calculations and statistical tests

VICH GL7 requires that an anthelmintic product produce a reduction (efficacy) of the 90% in the parasite burden of treated animals versus control group parasite burden, for approval. VICH GL7 recommends the use of the geometric mean of the parasite burden. In order to accommodate data with zero values, Williams mean was used (Alexander, 2012; Williams, 1937) (Formula 1).

$$\%Efficacy = \frac{(WM \text{ of metacercariae in CG} - WM \text{ of metacercariae in TG})}{WM \text{ of metacercariae in CG} \times 100}$$

Formula 1 Efficacy: reduction of worm burden. Williams Mean

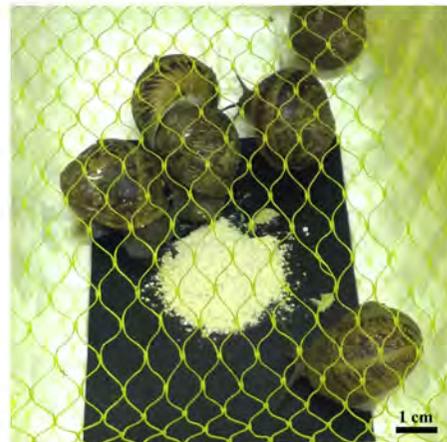


Fig. 3. Dose Confirmation test: Snail food mixed with PZQ disposed on a small plastic plate (8.5 cm × 7.0 cm) in the boxes housing *C. aspersum* treatment group.

(WM). Control Group (CG). Treatment Group (TG).

Mann–Whitney's test (significance $p \leq 0.05$) was performed using SPSS v.21, to assess significant differences in metacercarial burden between control and treatment groups (Rózsa et al., 2000). In order to assess significant differences in prevalence between control and treatment groups, proportion test (two sided, 95% confidence level) was performed using R version 3.0.2 under Rcmdr package version 2.0–3.

In the dose confirmation trial, differences in food consumption between the control and the treatment snails were assessed by One Factor Analysis of Variance (ANOVA) (significance $p < 0.05$) and intra-differences in food consumption between boxes in each group were assessed by Post-Hoc Tukey.

2.6. Development of the analytical method for the determination of praziquantel

The development process was conducted following EMA guidelines (EMA, 2011). HPLC-MS/MS materials and instrumentation, conditions, Calibration standard solutions, Calibration curves, Quality control samples, Lower Limit of Quantification (LLOQ), Upper Limit of Quantification (ULOQ), Selectivity, Carry over, Accuracy, Precision, Dilution integrity, Recovery and Stability requirements are detailed as supplementary information.

2.6.1. Sample and pool preparation

Cornu aspersum specimens were purchased from a public market (Barcelona, Spain). The shell was carefully removed from each snail and the entire body was individually stored at -20°C for at least 24 h. Samples were individually placed in plastic petri dishes, cut into small pieces using a 10 scalpel blade, introduced into a 15 ml glass vial, weighed and homogenized by the Ika T10 basic Ultra-Turrax with the S10-N–10 g disperser tool for 3 min at 16,000–20,000 rpm in 10 ml HPLC-grade methanol. Each blended snail was centrifuged at 4000 rpm for 5 min in a 15 ml centrifuge tube. Supernatant was transferred into a syringe with Durapore PVDF 0.45 μm \varnothing Millipore Millex-HV syringe-driven filter unit and filtered to a click glass vial. Each filtered snail extract sample was individually stored at -20°C . Just before to be used, the extract was diluted 1:10 with HPLC-grade methanol (matrix extract). A filtered snail extract pool for calibration standards was obtained by processing and mixing the extract from 5 specimens of *C. aspersum* and diluting 1:10 with HPLC-grade methanol (=matrix extract pool).

2.6.2. Praziquantel quantification in treated snails

C. aspersum specimens ($n = 60$) were purchased in a Spanish public market and disposed in plastic boxes (23 cm \times 13 cm \times 8 cm) in groups of 10 specimens/box, covered with a net, maintained in the conditions described in 2.2.3. The group was treated 3 days *ad libitum*, each day 2 g of PZQ supplemented snail food (11 mg PZQ/g snail food) were disposed on a small plastic plate (8.5 cm \times 7.0 cm) inside the boxes. At the end of the assay, samples were prepared for analysis as described in Section 2.6.1.

3. Results

3.1. Exploratory study *Brachylaima metacercariae* identification and prevalence in marketplace C. *aspersum*

The exploratory study performed in marketplaces showed that the *Brachylaima* prevalence and the metacercarial burden reached high values: up to 80% in prevalence, and until 80 metacercariae/snail (Table 1). *Brachylaima metacercariae* were present in all the six marketplaces analyzed. The lowest prevalence was detected in snails from marketplace B, where the 50% of the snails appeared

parasitized by *Brachylaima metacercariae*. In marketplaces A and D, the higher prevalence was observed, reaching 80% of the snails parasitized by this trematode metacercariae. According to the confidence intervals (CI) (Table 1) marketplaces A and D accomplished the inclusion criterion necessary to use the snails in the Dose determination and Dose confirmation tests, taking into account that the lower limit of prevalence in terms of confidence interval was 68.9% (>60%).

3.2. Dose determination tests

Doses of 1.2, 1.8 and 2.4 mg/PZQ/snail were tested as indicated (2.3). Dose of 1.2 PZQ mg/snail resulted insufficient to meet the VICH GL7 criteria, achieving only 64.8% of efficacy (Lot 1) (the mean ranks of control group and treatment group were 59.59 and 40.21 respectively; $U = 745$, $Z = -3.422$, $p = 0.001$) (Table 2).

Doses of 1.8 mg PZQ/snail (Lot 2) and 2.4 mg PZQ/snail (Lot 3) achieved the efficacy requirements demanded by VICH GL7 guideline. The reduction in the metacercarial burden was, respectively, 97.3% (the mean ranks of control group and treatment group were 68.70 and 26.54 respectively; $U = 140$, $Z = -7.721$, $p < 0.001$) and 98.7% (the mean ranks of control group and treatment group were 67.16 and 32.49, respectively; $U = 367$, $Z = -6.919$, $p < 0.001$) in Lot 2 and Lot 3 respect to their control groups (Table 2), respectively.

The prevalence in the group treated with the dose of 1.8 mg PZQ/snail (Lot 2) was reduced from 94.0% (control group) to 17.4% ($X^2 = 57.466$, $df = 1$, $p < 0.001$). The dose of 2.4 mg PZQ/snail (Lot 3) reduced the prevalence from 72.0% (control group) to 2.04% (treatment group) ($X^2 = 51.748$, $df = 1$, $p < 0.001$) (Table 2).

Results showed that dose of 2.4mgPZQ/snail, tested in Lot 3 offered the best efficacy against the *Brachylaima metacercariae* parasitizing *Cornu aspersum*, clearly meeting the criteria expressed by the European guidelines. Taking into account the mean weight of the snails in lots and the snail food consumed by each snail in each lot, it is possible to know the mean ingestion of PZQ by kg of snail (Table 3).

The number of snails that finished its dose, in the Dose Determination tests, was noted each day in order to have a first approach to the PZQ supplemented snail food consumption behavior (Fig. 4). On day 4, 92% of snails from Lot 1 receiving 100 mg of snail food finished their assigned dose, on day 6, 87% of snails from Lot 2 receiving 150 mg and on day 7, 90% of snails from Lot 3 receiving 200 mg of snail food. This was data was used to choose the duration of the dose confirmation tests. [Link to a video for watching a snail receiving treatment.]

Supplementary video related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.013>

Along the three first days of the Dose Determination tests, 34 snails ingested all the disposed food in Lot 1, 29 in Lot 2 and 37 in Lot 3. The maximum number of snails eating all the disposed snail food in a day was 16 in the Lot 1, 14 in Lot 2 and 16 in Lot 3 (Fig. 5). The percentage of snails that consumed their dose, as only dose, was 80.6%.

3.3. Dose confirmation tests

Results in Dose determination (3.2) showed that dose of 2.4mgPZQ/snail, tested in Lot 3 offered the best efficacy. This dose was tested to confirm its activity, as indicated (2.4). Snail food supplemented with PZQ (2.4 mg PZQ/snail) was offered *ad libitum* during 7 days. The reduction in the metacercarial burden was 94.6% in the treated snails (Mean ranks of control group and treatment group for the number of alive metacercariae were 130.38 and 68.62 respectively; $U = 1843$; $Z = -8.577$; $p < 0.001$, in the

Table 2
PZQ efficacy assessment in dose determination assays using the reduction in the metacercarial burden and in the prevalence (%). n = Number of specimens per group. CI=Confidence interval.

Metacercarial burden	Marketplace A					
	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Control (n = 50)	Treatment 1.2 mg/snail (n = 49)	Control (n = 50)	Treatment 1.8 mg/snail (n = 46)	Control (n = 50)	Treatment 2.4 mg/snail (n = 49)
Range	0–100	0–22	0–100	0–9	0–70	0–3
Arithmetic Mean ± SD	7.90 ± 15.6	2.27 ± 4.03	15.96 ± 20.60	0.48 ± 1.49	5.44 ± 11.07	0.06 ± 0.43
Williams Mean	3.22	1.13	8.44	0.23	2.27	0.03
Efficacy	–	64.8%	–	97.3%	–	98.7%
Prevalence assessment						
Prevalence	86.0%	59.2%	94.0%	17.4%	72.0%	2.04%
Prevalence CI 95%	76.4%–95.6%	–	87.4%–100%	–	60.0%–83.0%	–

Table 3
Dose of PZQ per kg of treated snails in lots assayed.

Snail lot	Marketplace A		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Snail food provided/snail	100 mg	150 mg	200 mg
mg PZQ ingested/snail	(1.2 mg PZQ/snail) n = 49	(1.8 mg PZQ/snail) n = 46	(2.4 mg PZQ/snail) n = 49
Mean weight of snail with shell (g)	8.15 ± 1.63	8.59 ± 1.45	7.37 ± 2.19
Mean weight of snail without shell (g)	6.29 ± 1.50	6.94 ± 1.28	4.58 ± 1.44
Mean mg PZQ/kg snail with shell	147.3 (122.73–184.16)	209.55 (179.32–252.02)	325.45 (250.87–463.14)

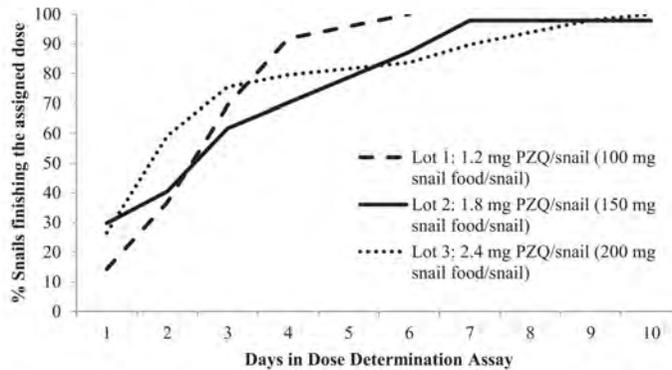


Fig. 4. Percentage of *C. aspersum* in Lots 1, 2, and 3 which are finishing the disposed snail food mixed with praziquantel (PZQ), along the days of the Dose Determination tests.

Mann–Whitney test) and the prevalence dropped until 10.1% in this group, from 68.7% in the control group ($X^2 = 71.161$; $df = 1$, $p < 0.001$) (Table 4).

3.4. Dose calculation

The control group consumed an average of 10.297 g of snail food per box and the treatment group 8.10 g per box in the assay (Tables 5 and 6). Significant differences ($p < 0.001$) were found between the control and the treatment group in the mean of snail food consumed per box along the 7 days of treatment. On the contrary, no significant differences were found neither between the ten boxes in the control group ($p = 0.996$) nor in the treatment group ($p = 0.998$) in the mean of snail food consumed per box along the assay (Tables 5 and 6).

In the dose confirmation assay, the mean weight of the

specimens in the treatment group was 7.68 g ± 1.53 (n = 99) with shell, and 5.20 g ± 1.14 (n = 99) without shell. The total amount of snail food consumed per day varied between 5.276 g and 20.378 g. The food ingestion behavior of the snails was characteristic. Along days 1 and 2, the average of snail food consumed per box and per day (mean = 0.504 ± 0.273, n = 20) was significantly ($p < 0.001$) different than the average consumed on days 3, 4, 5, 6 and 7 (mean = 1.426 ± 0.401, n = 50) ($p < 0.001$). Control snails acted in a similar way: along days 1 and 2, the average of snail food consumed per box and per day (mean = 0.814 ± 0.679 g, n = 20), differed significantly from consumes on days 3, 4, 5, 6 and 7 (mean = 1.725 ± 0.605 g, n = 50). In order to proceed to dose calculation, only data from these five last days in the study were employed. Using, additionally, the mean weight of snails with shell and the quantity of PZQ added to snail food (12 mg PZQ/g snail food), the mean ingestion was 220.2 mg PZQ/kg snail. This dose fit

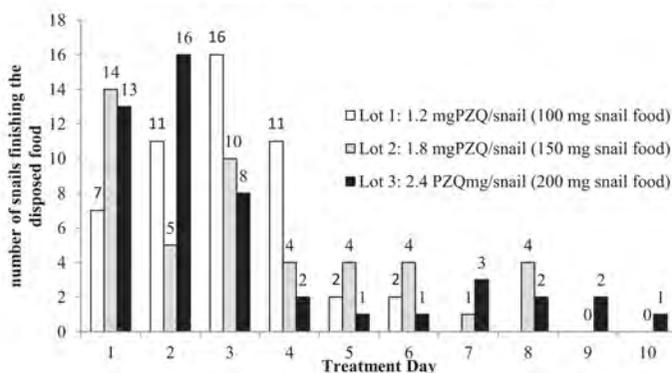


Fig. 5. Number of *C. aspersum* finishing all the disposed snail food mixed with praziquantel in each day of the Dose determination tests. assay.

Table 4

PZQ efficacy assessment in dose confirmation assay using the reduction in the metacercarial burden and in the prevalence (%). n = Number of specimens per group. *One dead snail on control group and one dead snail on treatment group occurred.

Marketplace A		
Metacercarial burden	Control (n = 99)	Treatment 2.4 mg PZQ/snail (n = 99)
Range	0–35	0–6
Arithmetic Mean	5.01 ± 7.38	0.26 ± 0.95
Williams' Mean	2.35	0.13
Efficacy	–	94.6%
Prevalence	68.7%	10.1%

Table 5

Snail food consumed by the control group per box and per day (placebo).

Control group (n = 99)	Box 1 n = 10	Box 2 n = 10	Box 3 n = 10	Box 4 n = 10	Box 5 n = 10	Box 6 n = 10	Box 7 n = 10	Box 8 n = 10	Box 9 n = 10	Box 10 n = 9	Snail food consumed per day
Day 1	0.321	0.167	0.127	0.257	0.250	0.463	0.379	0.249	0.610	0.029	2.852
Day 2	0.278	0.035	0.616	0.858	0.681	0.013	0.558	0.600	0.904	0.389	4.932
Day 3	1.896	1.157	2.008	2.004	0.964	1.885	2.059	2.038	2.003	2.031	18.045
Day 4	2.018	2.016	2.065	2.079	1.441	2.011	2.028	2.062	1.623	1.897 ^a	19.24
Day 5	2.030	2.031	2.024	2.039	2.063	2.081	2.061	2.038	2.065	1.405	19.837
Day 6	1.955	1.845	1.492	1.744	1.689	2.086	1.844	2.046	1.782	1.041	17.524
Day 7	2.100	2.030	2.063	2.034	2.059	2.061	2.063	2.055	2.014	2.061	20.54
Snail food consumed per box	10.598	9.281	10.395	11.015	9.147	10.6	10.992	11.088	11.001	8.853	102.970

All measurements in g.

^a One snail dead.

Table 6

Snail food consumed by the treatment group per box and per day (12 mg PZQ/g snail food).

Treatment group (n = 99)	Box 1 n = 10	Box 2 n = 10	Box 3 n = 10	Box 4 n = 10	Box 5 n = 10	Box 6 n = 10	Box 7 n = 10	Box 8 n = 10	Box 9 n = 10	Box 10 n = 9	Snail food consumed per day
Day 1	0.728	0.447	0.910	0.662	0.662	0.111	0.737	0.292	0.191	0.536	5.276
Day 2	0.721	0.670	0.619	0.364	0.364	0.355	0.223	0.832	0.212	0.999	5.359
Day 3	1.367	1.333	1.303	1.036	1.036	1.771	1.599	1.710	1.764	1.572	14.491
Day 4	1.367	1.195	1.426	1.197	1.197	1.291	1.525	0.959	1.613	1.380 ^a	13.150
Day 5	1.248	1.287	0.943	0.992	0.992	1.245	1.153	0.960	0.878	0.927	10.625
Day 6	1.063	0.913	1.707	0.888	0.888	0.755	1.491	1.409	1.433	1.180	11.727
Day 7	2.057	2.025	2.029	2.058	2.058	2.019	2.038	2.016	2.07	2.008	20.378
Snail food consumed per box	8.551	7.870	8.937	7.197	7.197	7.547	8.766	8.178	8.161	8.602	81.006

All measurements in g.

^a One snail dead.

in the interval (mg PZQ/kg snail 179.32–252.02) provided by the administration of 150 mg of supplemented snail food (Table 3) in the dose determination assay. Thus, the results obtained offering snail food supplemented with 2.4 mg PZQ/snail *ad libitum* along 7 days indicated that the efficacy (94.6%) of the anthelmintic also met the VICH GL7 criterion ($\geq 90\%$) in grouped snails. This dosage design could be easily reproducible in snail farms.

3.5. Development of the analytical method for the determination of praziquantel

In the present work, a sensitive bioanalytical method is developed according to EMA guidelines (EMA, 2011) to quantify praziquantel in *Cornu aspersum* (Helicidae) intended for human consumption. Extraction of praziquantel was achieved with methanol, consuming a minimum, sustainable quantity of solvent (10 ml/sample).

3.5.1. Calibration curves, lower limit of quantification (LLOQ), selectivity and carry over

Significant linearity was presented by the two calibration curves obtained from 0.05 to 0.8 $\mu\text{g/ml}$ (linear, $r_2 = 0.999$, $r_2 = 0.999$, $r_2 = 0.999$) and from 0.8 to 6 $\mu\text{g/ml}$ (linear, $r_2 = 0.996$, $r_2 = 0.997$, $r_2 = 0.999$) standard solutions, respectively. All back-calculated concentrations were within $\pm 15\%$ of the nominal value, and they were within $\pm 20\%$ for the LLOQ, in the calibration curves. LLOQ was established in 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of praziquantel in matrix extract pool, the lowest concentration that accomplished the EMA requirements of accuracy and precision. Taking into account that a snail dish includes about 25 specimens and that the PZQ ADI is 10mg/person, the maximum allowed amount of PZQ would be 0.4 mgPZQ/snail. The LLOQ of 0.05 $\mu\text{g/ml}$ corresponds to 5 $\mu\text{gPZQ/snail}$ which is 80 times lower than the maximum calculated amount, thus, the method is sensitive enough to quantify PZQ according regulations. The LLOQ integrated peak area (mean = 75949.23, SD = 1038.87, $n = 5$) largely accomplished the conditions over the blank sample signals (mean = 1863.18, SD = 81.24, $n = 6$). So, the method could detect quantities of praziquantel that allowed assure the food safety. Six *C. aspersum* snails were individually processed and analyzed. As EMA indicated, individual responses (between 624.817 and 10018.079) were less than 20% of the mean LLOQ signal obtained from five replicates (mean 68391.686; SD = 308.096, $n = 5$), which indicated a good selectivity for the analyte. The method did not imply carry over, since the signal from six blank samples injected in alternance with six injections of the maximum concentration standard (6 $\mu\text{g/ml}$ matrix extract pool) was, in each case, lower than 20% of the signal from the LLOQ. Results largely confirmed the lack of carry over in the method (Five replicates of LLOQ signal: mean = 75949.231; SD = 1038.878, $n = 5$; six blank samples: mean = 1863.175; SD = 81.238, $n = 5$).

3.5.2. Accuracy and precision

The method provided a good accuracy since the mean deviation of back-calculated concentrations found with analyzed samples from the nominal values, for each concentration level was within $\pm 15\%$ of the nominal value, and for LLOQ it was within $\pm 20\%$ for within-run accuracy and between-run accuracy (3 runs) (Table 7). The three runs analyzed to assess the precision of the method accomplished independently the EMA criteria ($\text{CV} \leq 15\%$, for both within-run precision and between-run precision).

3.5.3. Dilution integrity, Recovery and Stability

Dilution integrity provided back-calculated concentrations (mean = 0.764 $\mu\text{g/ml}$, SD = 0.008, CV = 1.104%) ranged within $\pm 15\%$ of the nominal values, as proposed by EMA. Appropriate recoveries

were achieved for both concentration levels: mean recovery for 0.08 $\mu\text{g/ml}$ was 91.800% (SD = 9.966, CV = 10.856%), and mean recovery for 5.0 $\mu\text{g/ml}$ was 86.900% (SD = 8.709, CV = 10.022%). Measurements of the analyte to test its short-term stability (24 h, room temperature), and freeze and thaw (unassisted at room temperature) stability were performed and the analyte was detected, being the back-calculated concentrations within $\pm 15\%$ of nominal concentrations as EMA required.

3.5.4. Determination of PZQ in treated snails

Untreated snails used as control were always negative for praziquantel. In spite of the individual variations in food intake, all treated snails ingested the snail food supplemented with praziquantel and the analyte was detected in all the treated individuals. Snails ($n = 60$) consumed 19.657 g of snail food, the theoretical ingestion of praziquantel based in this consume was 3.603 mg PZQ/snail and in the experimental determination was 0.363 mg PZQ/snail. Taking into account the weight (3.89 ± 0.94 g) of the snails, the theoretical proportion of praziquantel was 0.924 mg PZQ/g snail and the experimental determination was 0.093 mg PZQ/g snail. These results suggested an elimination of the drug by the snails along the assay.

4. Discussion

Results in the present work clearly highlighted three facts: firstly, praziquantel was effective against *Brachylaima* metacercariae parasitizing *Cornu aspersum*, according with the VICH GL7 guideline; secondly, satisfactory treatment can be achieved by oral dosage of snail food supplemented with the anthelmintic; and, thirdly, the anthelmintic was well tolerated by the helioid.

4.1. Efficacy of the treatment with praziquantel

In terms of efficacy, this has been the first attempt to establish a treatment for *C. aspersum* terrestrial edible snails parasitized by *Brachylaima* metacercariae at laboratory with satisfactory efficacy results; the reduction in the metacercarial burden was 94.6% in the treated snails and the prevalence dropped until 10.1% in this group, from 68.7% in the control group.

Few works are available on the efficacy of praziquantel treatment of gastropods parasitized by trematodes. The most recent, was performed on the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Lymnaeidae) parasitized by *Echinoparyphium aconatum* (Trematoda: Echinostomatidae), using a bath of PZQ (10 mg/L) and a decrease in the cercarial shedding was observed (Voutilainen, 2011). Riley and Chappell (1990) treated *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni* administering PZQ over a 72 h period, in this case in the food (20–30 $\mu\text{g/g}$ body weight including shell weight), detecting a cercarial shedding reduction between 85 and 95%. This dose was lower than the lowest used to treat *C. aspersum* and, also, the period of administration was lower. In *C. aspersum*, dose of 147.3 (122.73–184.16) mgPZQ/kg snail with shell did not provide efficacy fitting the VICH GL7 guideline, as indicated in dose determination assays. More recently, Mattos et al. (2007) evaluated the effect of PZQ (1000 mg/kg snail with shell) in food by oral ingestion in *B. glabrata* infected with *S. mansoni*, obtaining 100% of reduction in cercarial shedding, although the mortality was very high (73.4%). This dose was remarkably higher than the used in the present work. Until the authors' knowledge, there are no records of terrestrial snails treated with PZQ. The success achieved in the administration of the anthelmintic by oral route provides an additional benefit because of its simplicity, and adequacy to the usual rearing of snails in farms.

Nevertheless, significant differences were detected between the

Table 7Accuracy and precision assessment for praziquantel in matrix extract pool of *C. aspersum* (SD = standard deviation; %CV=SD/mean·100) in accordance with EMA requirements.

Nominal concentration (µg/ml)	Run 1		Run 2		Run 3	
	Accuracy back-calculated concentration (µg/ml) Mean ± SD (n = 5)	Precision %CV	Accuracy back-calculated concentration (µg/ml) Mean ± SD (n = 5)	Precision %CV	Accuracy back-calculated concentration (µg/ml) Mean ± SD (n = 5)	Precision %CV
0.05	0.057 ± 0.001	1.384	0.058 ± 0.000	0.788	0.059 ± 0.001	1.423
0.08	0.078 ± 0.001	1.695	0.076 ± 0.001	1.792	0.084 ± 0.001	1.641
0.4	0.393 ± 0.006	1.532	0.400 ± 0.003	0.770	0.357 ± 0.007	1.904
0.6	0.610 ± 0.006	0.931	0.592 ± 0.007	1.136	0.656 ± 0.011	1.739
0.8	0.749 ± 0.042	5.662	0.804 ± 0.007	0.929	0.806 ± 0.016	2.003
1.0	0.959 ± 0.015	1.600	0.910 ± 0.008	0.921	0.919 ± 0.013	1.405
4.0	3.965 ± 0.072	1.813	4.173 ± 0.052	1.241	4.182 ± 0.069	1.646
5.0	4.743 ± 0.092	1.949	5.107 ± 0.034	0.669	5.198 ± 0.064	1.224

amount of consumed food: control snails consumed 73.55% of the disposed food and treated snails consumed 57.15%. Actually, the mean snail food consumed per box (n = 10 boxes) at the end of the dose confirmation assay was significantly different between control boxes (10.30 g ± 0.87) and treated ones (8.10 g ± 0.63) (p < 0.001). Also, differences were observed in the mean food ingested by control and treated snails (148.59 mg and 116.88 mg, respectively) at the end of the assay. Maybe the taste of the food supplemented with PZQ became special for snails and some transitory dislike appeared. PZQ taste is bitter and disgusting for humans (Meyer et al., 2009). Also, the bitterness of PZQ has been reported as a problem to achieve satisfactory treatment against monogenean parasites in the yellowtail kingfish (Partridge et al., 2014). Tolerance of the snails to the anthelmintic was high since only one treated snail died along the dose confirmation assay (mortality 1%), and one specimen died in this assay in the control group (mortality 1%). Different situation was reported by Riley and Chappell (1990) who indicated a high mortality rate in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* when PZQ oral dose exceeded 30 mg/kg. Mortality of 73.4% was recorded by Mattos et al. (2007) when treated the same snails with PZQ 1000 mg/kg. Data suggested a different toxicity profile for this snail species.

PZQ has been more commonly used to treat vertebrates parasitized with trematodes like *Echinostoma paraensei* in experimentally infected hamsters (oral single dose of 30 mg/kg) with worm reductions of 100% in the small intestine 30 min after the administration (Gonçalves et al., 2013). Different doses of PZQ (75, 150, 300 mg/kg oral single dose) were used to treat rats and statistically significant reduction in the mean worm burden (84%) was only achieved with the 300 mg/kg dose (Xiao et al., 2011). In the present work the best worm burden reduction was of 98.7% in dose determination assays, when snails were individually treated, and of 94.6% when snails were group treated (10 snails box) sharing similar results with the above mentioned works. The dosage and duration of the treatment differ from one trematode to another, and it also depends on the treated host.

4.2. Development of the analytical method for the determination of PZQ

Additionally, a sensitive bioanalytical method was developed according to EMA guidelines (EMA, 2011) to quantify praziquantel in *C. aspersum*. Extraction of praziquantel was achieved with methanol, consuming a minimum, sustainable quantity of solvent (10 ml/sample). The extract was stable after 24 h at room temperature and after 24 h, 1, and 3 months frozen (−20 °C) and thawed, which permits the delay of the analysis and the maintenance of samples for food controls. LLOQ was established in 0.05 µg/ml praziquantel/matrix extract pool, the lowest concentration that

accomplished the EMA requirements of accuracy and precision. The recovery for praziquantel (up to 91.8%) in the present work was similar to that reported by Hanpitakpong et al. (2004) for praziquantel in plasma (>90%) and by Kim et al. (2001) for praziquantel in fish muscle (82.7%). Xie et al. (2012) recovered below 50% in pork tissue.

4.3. Determination of PZQ in treated snails

In the determination in specimens treated with 11 mg PZQ/g snail food *ad libitum* during 3 days, the experimental results (0.363 mg PZQ/snail and 0.093 mg PZQ/g snail) represented the 10% of the theoretical calculations based on the snail food consumed (3.603 mg PZQ/snail and 0.924 mg PZQ/g snail). These results agree with the elimination quantification of praziquantel in sheeps, in which the 88% of the drug was eliminated after 24 h from the administration time. In rats, the elimination of praziquantel from their organs and tissues was almost complete 24 h after the oral administration of 10 mg/kg bw. The elimination is similar in dogs and monkeys (EMA, 1996).

4.4. *C. aspersum* dispersion and brachylaimiasis

In short time, brachylaimiasis progress could be a real concern because of the invasive character of its vector, *C. aspersum* (Arnaud et al., 2003; Peltanová et al., 2012). This species was native from the West Mediterranean and now has colonized all continents except Antarctica (Guiller et al., 2012, 2001). Its abundance in some agricultural areas in temperate and subtropical regions contributes to its consideration as a pest (Gaitán-Espitia et al., 2013), since egg laid is resistant to toxins as Cry1A contained in transgenic crops (Kramarz et al., 2009). Its invasive success could be explained by evidences related to the fact that populations adapted to warmer temperatures showed higher optimal temperature and higher maximum performance (Dahirel et al., 2013; Gaitán-Espitia et al., 2013). These traits are favorable to the geographical dispersion in uncertain scenarios (Ansart and Vernon, 2004; Ansart et al., 2008) as the actual climatic change, where an increase in temperature is expected (Gaitán-Espitia et al., 2013). Life cycle aspects of *Brachylaima* as the cercarial production and cercarial output (Mas-Coma et al., 2009) could be enhanced by climate change, highly increasing the metacercarial parasitization in the vector. *Brachylaima* sp. cercariae are able to infect land snails of multiple families of Stylommatophora and *C. aspersum* can act as vector of different *Brachylaima* metacercariae (Adema and Loker, 2015; Butcher and Grove, 2001).

Evidences for this geographical dispersion are the recent records of new hosts for *Brachylaima* adults: *Procyon lotor* in Japan (Matoba et al., 2006), *Sorex vagrans* in Montana (USA) (Kinsella, 2007),

Atlantorexus getulus in Morocco and Canary Islands (López-Darías et al., 2008), *Apodemus* sp. in Slovakia (Ondříková et al., 2010), *Rattus norvegicus* in Italy (Milazzo et al., 2010), *Cariacina cristata* in Argentina (Lunaschi and Drago, 2012), *Zenaida auriculata* in Brazil (Taroda et al., 2013) and *Apodemus agrarius* in Korea (Sohn et al., 2014). Brachylaimiasis could reach a medical concern considering that in some trematode infections, eggs can enter the systemic circulation and reach other tissues and organs producing pathological lesions (Africa et al., 1935; Belizario et al., 2001; Kean and Breslau, 1964), as in cardiac tissue and, coincidentally, two of the human brachylaimid cases in Australia (Butcher et al., 1996) had cardiac conditions in which systemic trematode infection could not be entirely discarded.

5. Conclusions

Some important factors converge on the edible land snail *C. aspersum* and on its parasitization by *Brachylaima* sp. metacercariae which can result in a plausible increase of human brachylaimiasis, giving the perfect scenario for an emerging food-borne disease: the lack of traceability of these snails in market-places and the absence of mandatory sanitary control obscure their parasitological status and increase the risk of ingestion of parasitized snails, taking into account the high prevalence of *Brachylaima* metacercariae; both *Brachylaima* metacercariae and *C. aspersum* have a cosmopolitan character and their geographical dispersion can progress in future scenarios outlined by the climate change; human cases of brachylaimiasis have been detected and their etiologic diagnosis is difficult.

In this context, the praziquantel treatment of *C. aspersum* could be a valuable tool because it is effective, well tolerated by the snail, affordable and easy to reproduce in snail farms.

Acknowledgments

The authors thank the ANCEC for its support with gastropod maintenance and providing snail food, the Scientific and Technological Centers of the UB (CCITUB) for their technical assistance, and the anonymous reviewers for his work which helped us to improve the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.013>.

References

- Adema, C.M., Loker, E.S., 2015. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Dev. Comp. Immunol.* 48, 275–283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.06.014>.
- Africa, C.M., García, E.Y., De Leon, W., 1935. Intestinal heterophyidiasis with cardiac involvement: a contribution to the etiology of heart failure. *Philipp. J. Public Health* 1, 1–35.
- Alexander, N., 2012. Review: analysis of parasite and other skewed counts. *Trop. Med. Int. Health* 17, 684–693.
- Ansart, A., Aulne, P.A., Maderc, L., Vernon, P., 2008. Influence of temperature acclimation and gut content on the supercooling ability of the land snail *Cornu aspersum*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 150, 14–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.02.013>.
- Ansart, A., Guillier, A., Maderc, L., 2009. In: *CABI (Ed.), CABI Invasive Species Compendium: Cornu Aspersum*, p. 19. London.
- Ansart, A., Vernon, P., 2004. Cold hardness abilities vary with the size of the land snail *Cornu aspersum*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 139, 205–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.09.003>.
- Arnaud, J.F., Maderc, L., Guillier, A., Deunff, J., 2003. Population genetic structure in a human-disturbed environment: a case study in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata). *Heredity* 90, 451–458. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800256>.
- Arrebola Burgos, J.R., 2002. Caracoles terrestres de Andalucía. *Consejería de Medio*

- Ambiente*, Sevilla, pp. 168–169.
- Belizario, V.Y., Bersabe, M.J., de Leon, W.U., Hilomen, V.Y., Paller, G.V., de Guzman, A.D., Bugayon, M.G., 2001. Intestinal heterophyidiasis: an emerging food-borne parasitic zoonosis in southern Philippines. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32, 36–42.
- Butcher, A., 2006. Review of Thirteen cases of *Brachylaima cribbi* intestinal fluke worm infection in Children and adults from south Australia. In: 2006 Annu. Sci. Meet. Exhib. Aust. Soc. Microbiol. (ASM 2006).
- Butcher, A.R., Brealey, J.K., Grove, D.L., Dymock, R.B., 2002. *Brachylaima cribbi* (Digenea: Brachylaimidae): Scanning electron microscopic observations of the life-cycle stages. *J. Helminthol.* 76, 207–215.
- Butcher, A.R., Grove, D.L., 2001. Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Syst. Parasitol.* 49, 211–221.
- Butcher, A.R., Parasuramar, P., Thompson, C.S., Grove, D.L., 1998. First report of the isolation of an adult worm of the genus *Brachylaima* (Digenea: Brachylaimidae), from the gastrointestinal tract of a human. *Int. J. Parasitol.* 28, 607–610.
- Butcher, A.R., Talbot, G.A., Norton, R.E., Kirk, M.D., Cribb, T.H., Forsyth, J.R., Knight, B., Cameron, A.S., 1996. Locally acquired *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) intestinal fluke infection in two South Australian infants. *Med. J. Aust.* 164, 475–478.
- Chai, J.Y., 2013. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Infect. Chemother.* 5, 32–43.
- Cinto, P.O., Souza, A.L.R., Lima, A.C., Chaud, M.V., Gremião, M.P.D., 2009. LC evaluation of intestinal transport of praziquantel. *Chromatographia* 69, 213–217.
- Chevallier, H., 1985. L'élevage des escargots: production et préparation du petit-gris. Editions du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, France.
- Cooper, J.E., Knowler, C., 1991. Snails and snail farming: an introduction for the veterinary profession. *Vet. Rec.* 129, 541–549.
- Coppo, J.A., 2008. Fisiología Comparada del Medio interno. Universidad Católica de Salta, Salta-Argentina, p. 309.
- Cribb, T.H., 1990. Introduction of a *brachylaima* species (Digenea: brachylaimidae) to Australia. *Int. J. Parasitol.* 20, 789–796.
- Dahirel, M., Ansart, A., Maderc, L., 2013. Stage- and weather-dependent dispersal in the brown garden snail *Cornu aspersum*. *Popul. Ecol.* 56, 227–237. <http://dx.doi.org/10.1007/s10144-013-0407-0>.
- Daniel, W.W., 2002. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa Wiley, México, pp. 176–177.
- EMA, 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed 05.11.14).
- EMA, 1998. Committee for Veterinary Medicinal Products "Praziquantel (Extension to Sheep Milk)". Summary Report (2) EMEA/MRL/523/98-final. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015787.pdf (accessed 05.11.14).
- EMA, 1996. Committee for Veterinary Medicinal Products "Praziquantel". Summary Report (1). EMEA/MRL/141/96-final. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015784.pdf (accessed 05.11.14).
- Fernández-López de Pablo, J., Badal, E., Ferrer García, C., Martínez-Ortí, A., Sanchis Serra, A., 2014. Land snails as a diet diversification proxy during the early upper palaeolithic in Europe. *PLoS One* 9, e104898. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104898>.
- Gaitán-Espitia, J.D., Belén Arias, M., Lardies, M.A., Nespola, R.F., 2013. Variation in thermal sensitivity and thermal tolerances in an invasive species across a climatic gradient: lessons from the land snail *Cornu aspersum*. *PLoS One* 8, e70662. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070662>.
- Gállego, L., González-Moreno, O., Gracenea, M., 2014. Terrestrial edible land snails as vectors for geographic dissemination of *Brachylaima* species. *J. Parasitol.* 100, 674–678.
- Gonçalves, J.P., Oliveira-Menezes, A., Maldonado Junior, A., Carvalho, T.M.U., de Souza, W., 2013. Evaluation of Praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Vet. Parasitol.* 194, 16–25.
- González-Moreno, O., Gracenea, M., 2006. Life cycle and description of a new species of brachylaimid (Trematoda: Digenea) in Spain. *J. Parasitol.* 100, 1305–1312.
- Gracenea, M., González-Moreno, O., 2002. Life cycle of *Brachylaima mascomai* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rats in the Llobregat Delta (Spain). *J. Parasitol.* 88, 124–133.
- Gracenea, M., González-Moreno, O., García Ruiz, R., Freixas, S., López de Arriba, M., 2009. *Brachylaima* metacercariae parasitizing terrestrial edible snails in public markets. *Acta Parasitol.* Port. 16, 168–169.
- Guillier, A., Coutellec-Vreto, M.A., Maderc, L., Deunff, J., 2001. Evolutionary history of the land snail *Helix aspersa* in the Western Mediterranean: preliminary results inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Ecol.* 10, 81–87.
- Guillier, A., Maderc, L., 2010. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: a new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *BMC Evol. Biol.* 10, 18.
- Guillier, A., Martin, M.-C., Hiraux, C., Maderc, L., 2012. Tracing the invasion of the mediterranean land snail *Cornu aspersum aspersum* becoming an agricultural and garden pest in areas recently introduced. *PLoS One* 7, e49674.
- Hanpitakpong, W., Banmairuoi, V., Kamanikom, B., Choemung, A., Na-Bangchang, K., 2004. A high-performance liquid chromatographic method for determination of praziquantel in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 871–876.
- Istituto Internazionale di Elicicoltura Cherasco, 2015. <http://www.lumache-elici>.

- com/ (accessed 30.03.15).
- IPCC, 2014. Summary for policymakers. In: Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (Eds.), *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part a: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1–32.
- IPCC, 2013. Summary for policymakers. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1–28.
- Jiang, H., Zeng, J., Kandoussi, H., Liu, Y., Wang, X., Bifano, M., Cojocar, L., Ryan, J., Arnold, M.E., 2012. A sensitive and accurate liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative determination of the novel hepatitis C NS5A inhibitor BMS-790052 (daclatasvir) in human plasma and urine. *J. Chromatogr. A* 1245, 117–121.
- Johansen, M.V., Monrad, J., Christensen, N.O., 1996. Effects of praziquantel on experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 62, 83–91.
- Kean, B.H., Breslau, R.C., 1964. Parasites of the human heart. In: *Cardiac Helminthology*. Grune and Stratton, New York, pp. 95–103.
- Kerney, M.P.R., Cameron, A.D., 1979. *A Field Guide to the Land Snails of Britain and Northwest Europe*. Collins, London, UK, p. 288.
- Kim, K.H., Kim, C.S., Kim, J.W., 2001. Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastes schlegelii* after oral and bath treatment. *Dis. Aquat. Organ* 45, 203–207.
- Kim, C.S., Cho, J.B., Ahn, K.J., Lee, J.I., Kim, K.H., 2003. Depletion of praziquantel in muscle tissue and skin of cultured rockfish (*Sebastes schlegelii*) under the commercial culture conditions. *Aquaculture* 219, 1–7.
- Kinsella, J., 2007. Helminths of the vagrant shrew, *Sorex vagrans*, from western Montana, USA. *Acta Parasitol.* 52, 151–155. <http://dx.doi.org/10.2478/s11686-007-0021-4>.
- Kramarz, P., de Vaulleury, A., Gimbert, F., Cortet, J., Tabone, E., Andersen, M.N., Krogh, P.H., 2009. Effects of Bt-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus aspersus*. *Appl. Soil Ecol.* 42, 236–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.04.007>.
- López-Darias, M., Ribas, A., Feliú, C., 2008. Helminth parasites in native and invasive mammal populations: comparative study on the Barbary ground squirrel *Atlantoxerus getulus* L. (Rodentia, Scuridae) in Morocco and the Canary Islands. *Acta Parasitol.* 53, 296–301. <http://dx.doi.org/10.2478/s11686-008-0036-5>.
- Lubell, D.L., 2004. Prehistoric edible land snails in the circum-Mediterranean: the archaeological evidence. *Petits animaux et sociétés humaines. In: du complément alimentaire aux ressources utiles XXIV^e Rencontres Internationales d'Archéologie et d'Histoire d'Antibes*, pp. 77–98.
- Lunaschi, L.I., Drago, F.B., 2012. Digenean parasites of *Cariama cristata* (Aves, Gruiformes) from Formosa Province, Argentina, with the description of a new species of the genus *Strigea*. *Acta Parasitol.* 57, 26–33. <http://dx.doi.org/10.2478/s11686-012-0004-y>.
- Mas-Coma, S., Gallego, J., 1975. Algunas consideraciones sistemáticas sobre las familias Brachylaemidae Joyeux y Foley, 1930 y Leucochloridiomorphae Travassos y Kohn, 1966 (Trematoda: Brachylaemoidea). *Rev. Iber. Parasitol.* 35, 339–354.
- Mas-Coma, S., Montoliu, I., 1986. The life cycle of *Brachylaema ruminae* n. sp. (Trematoda: Brachylaemidae), a parasite of rodents. *Z. Parasitenkd* 72, 739–753.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargaues, M.D., 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 163, 264–280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.024>.
- Matoba, Y., Yamada, D., Asano, M., Oku, Y., Kitaura, K., Yagi, K., Tenora, F., Asakawa, M., 2006. Parasitic helminths from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *Helminthologia* 43, 139–146. <http://dx.doi.org/10.2478/s11687-006-0027-8>.
- Mattos, A.C.A., Pereira, G.C., Jannotti-Passos, L., Kusel, J.R., Coelho, P.M.Z., 2007. Evaluation of the effect of oxamiquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 102, 84–91.
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R., Kijlstra, A., 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 221–270.
- Meyer, T., Sekljic, H., Fuchs, S., Bothe, H., Schollmeyer, D., Miculka, C., 2009. Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000357>.
- Milazzo, C., Ribas, A., Casanova, J., Cagnin, M., Geraci, F., Bella, C., 2010. Helminths of the brown rat (*Rattus norvegicus*) (Berkenhout, 1769) in the city of Palermo, Italy. *Helminthologia* 47, 238–240. <http://dx.doi.org/10.2478/s11687-010-0037-4>.
- Ministry of Agricultura, Nutrition and Environment Spanish Government, 2015. *Lacria de caracoles: una opción ganadera en la agricultura catalana*. http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_DT%2FDT_2010_46_3_7.pdf (accessed 05.11.14).
- Ondříková, J., Miklisová, D., Ribas, A., Stanko, M., 2010. The helminth parasites of two sympatric species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae) from south-eastern Slovakia. *Acta Parasitol.* 55, 369–378. <http://dx.doi.org/10.2478/s11686-010-0043-1>.
- Partridge, G.J., Michael, R.J., Thuillier, L., 2014. Praziquantel form, dietary application method and dietary inclusion level affect palatability and efficacy against monogenean parasites in yellowtail kingfish. *Dis. Aquat. Organ* 109, 155–163.
- Peltanová, A., Petrušek, A., Kment, P., Juricková, L., 2012. A fast snail's pace: colonization of Central Europe by Mediterranean gastropods. *Biol. Invasions* 14, 759–764. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-011-0121-9>.
- Pica-Mattocchia, L., Cioli, D., 2004. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int. J. Parasitol.* 34, 527–533.
- Pojmanska, T., 2002. In: Gibson, David Ian, Jones, Arlene, Bray, Rodney Alan (Eds.), *Keys to the Trematoda, Superfamily Brachylaemoidea Joyeux Foley 1930*, vol. 1. CABI Publishing Series, pp. 37–43.
- Prochile, 2011. Estudio de mercado de caracoles de tierra en Francia. In: http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files/mf/documento_01_04_12173158.pdf (accessed 30.03.15).
- Riditid, W., 2002. LC determination of praziquantel in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 181–186.
- Riley, E.M., Chappell, L.H., 1990. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 101, 211–217.
- Rózsa, L., Reiczgel, J., Majoros, G., 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *J. Parasitol.* 86, 228–232.
- Segade, P., Crespo, C., García, N., García-Estévez, J.M., Arias, C., Iglesias, R., 2011. *Brachylaema aspersae* n. sp. (Digenea: Brachylaemidae) infecting farmed snails in NW Spain: Morphology, life cycle, pathology, and implications for heliciculture. *Vet. Parasitol.* 175, 273–286.
- Shirakashi, S., Andrews, M., Kishimoto, Y., Ishimaru, K., Okada, T., Sawada, Y., Ogawa, K., 2012. Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture* 326–329, 15–19.
- Sirgel, W.F., Artigas, P., Bargaues, M.D., Mas-Coma, S., 2012. Life cycle of *Renyliama capensis*, a brachylaemid trematode of shrews and slugs in South Africa: two-host and three-host transmission modalities suggested by epizootiology and DNA sequencing. *Parasites Vectors* 2012, 5, 169.
- Sirgel, W.F., Mas-Coma, S., 2010. *Renyliama capensis* n. gen., n. sp. (Trematoda: Brachylaemidae) from the urinary system of the shrew *Myosorex varius* Smuts, 1832 (Insectivora: Soricidae). *Parasitol. Res.* 106, 1443–1453.
- Sohn, W.-M., Na, B.-K., Song, H.-J., Kim, C.-M., Nam, G.-J., 2014. Intestinal Helminthic infections in Striped Field Mice, *Apodemus agrarius*, from two Southern Regions of Korea. *Korean J. Parasitol.* 52, 419–423. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2014.52.4.419>.
- Taroda, A., de Barros, L.D., Zulpo, D.L., da Cunha, I.A.L., Paiva, M.C.D.C., Sammi, A.S., dos Santos, J.R., Yamamura, M.H., Vidotto, O., Garcia, J.L., 2013. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaidia macroura* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.* 22, 415–419. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300016>.
- United Nations, 2014. COMTRADE Database DESA/UNSD. <http://comtrade.un.org/> (accessed 26.11.14).
- VICH, 2000. VICH Topic GL7 Efficacy of Anthelmintics: General Requirements.
- Voutilainen, A., 2011. In vivo efficacy of praziquantel against *Echinoparyphium acointium* (Trematoda: Echinostomatidae) parasitizing the great pond snails *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Exp. Parasitol.* 129, 72–74.
- Williams, C.B., 1937. The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems. *Ann. Appl. Biol.* 24, 404–414.
- Xiao, S., Xue, J., Xu, L., Zhang, Y., Qiang, H., 2011. Comparative effect of mebendazole, albendazole, tribendimidine, and praziquantel in treatment of rats infected with *Clonorchis sinensis*. *Parasitol. Res.* 108, 723–730.
- Xie, W., Han, C., Hou, J., Wang, F., Qian, Y., Xi, J., 2012. Simultaneous determination of multiveterinary drug residues in pork meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with solid phase extraction. *J. Sep. Sci.* 35, 3447–3454.
- Yamaguti, S., 1975. *A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates*. Keigaku Publishing Co, Tokyo, Japan, 590 + pl. 219.
- Yamaguti, S., 1971. *Synopsis of the Digenetic Trematodes of Vertebrates*, vol. 1. Keigaku Publishing Company, Tokyo, Japan, p. 1074. Vol. 2, pl. 349.
- Zelmer, D.A., 2013. Estimating prevalence: a confidence game. *J. Parasitol.* 99, 386–389.
- Zhao, M., 2005. Specific method for determination of gefitinib in human plasma, mouse plasma and tissues using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 819, 73.

SUPPLEMENTARY
INFORMATION

**Development of the analytical method
for the determination of praziquantel**

Materials and instrumentation

Praziquantel (lot number L11060258, 99.52% pure) was obtained from Fagron Iberica, S.A.U. (Terrassa, Spain). Methanol (HPLC Grade) and acetonitrile (HPLC Grade) were purchased from Panreac Química S.A.U. (Barcelona, Spain). Durapore PVDF 0.45 μm \varnothing Millipore Millex-HV syringe-driven filter unit was obtained from Millipore Iberica (Madrid, Spain). Deionized water was obtained from a Milli-Q Gradient A10 System (Millipore). Number 10 scalpel blades were purchased from Corysan S.A. (Viladecans, Spain). An Ika T10 basic Ultra-Turrax homogenizer with a S10-N-10 g disperser tool was acquired from IKA (Staufen, Germany). An aeADAM® PW124 balance was purchased from Adam Equipment, Co. Ltd. (Milton Keynes, United Kingdom). The 15 ml click glass vials (21mmx65mm) were obtained from Anorsa Aparatos Normalizados S.A. (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona).

HPLC-MS/MS conditions

An Acquity UPLC system, equipped with a binary pump and DAD detector (Waters, Milford MA, USA) and coupled to an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, Concord, Ont., Canada), was used. The reversed stationary phase employed was a Luna C18 column 50 x 2.0 mm id., 5 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase was acetonitrile as eluent A and 0.1% acetic acid in Milli-Q water as eluent B. The elution started at 25% of A and was increased linearly up to 65% of A in 2.5 min and kept isocratic for 0.5 min. It was returned to the initial conditions in 0.1 min and the reequilibration time was 1.9 min. The flow rate was 1.00 ml/min. All the samples were filtered through 0.22 μm filters before the chromatographic analyses and the injection volume was 10 μl .

Ionization was achieved with a TurboIonSpray interface (ESI) operating in positive mode and data were collected in multiple reaction monitoring mode (MRM). The ionization parameters were: capillary

voltage 5000 V, nebulizer gas (N_2) 8 (arbitrary units), curtain gas (N_2) 8 (arbitrary units), collision gas (N_2) 4 (arbitrary units), declustering potential (DP) 100 V, focusing potential (FP) 300 V, entrance potential (EP) 10 V, collision energy (CE) 30 V, and drying gas (N_2) heated up to 350°C at a flow-rate of 5000 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. MRM acquisition involved recording two transitions, 313.2/203.3 and 313.2/83.2, with a dwell time of 200 ms. The first transition was used for quantitation purposes and the second one only for confirmation, as it was more likely that the analyzed ions were from praziquantel molecules. Analyst® version 1.4 software (Sciex) on a PC was used for data acquisition and processing.

Calibration standard solutions and Calibration curves and Quality control samples

Twelve calibration standard solutions were prepared by using matrix extract pool, to obtain the following concentrations of praziquantel: 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 and 6.0 $\mu\text{g/ml}$ (praziquantel/matrix extract pool). Two calibration ranges were developed following EMA guidelines on bioanalytical method validation (EMA, 2011). The low calibration curve included seven levels: 0.05 (LLOQ), 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 $\mu\text{g/ml}$. The high calibration curve included five levels: 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, and 6.0 (ULOQ). Both calibration standards were evaluated in triplicate.

Quality control (QC) samples were prepared independently with matrix extract pool at three different final concentrations of praziquantel for ordinary analytical run control: low QC (0.08 $\mu\text{g/ml}$), medium QC (2.0 $\mu\text{g/ml}$) and high QC (5.0 $\mu\text{g/ml}$) (praziquantel/matrix extract pool).

Lower limit of quantification (LLOQ) and Upper Limit of Quantification (ULOQ), Selectivity and Carry over

The lower limit of quantification (LLOQ) was fixed in 0.05 $\mu\text{g/ml}$. The LLOQ is the lowest concentration of the analyte which can be quantified reliably meeting the accuracy and precision criteria of the EMA guidelines (EMA, 2011). The LLOQ signal should be at least 5 times the signal of a blank sample (snail

extract without praziquantel). Five replicates of LLOQ and six blank samples were analyzed. The upper limit of quantification (ULOQ) was fixed in 6 µg/ml. The ULOQ is the highest concentration of the analyte included in the calibration curves.

Selectivity, according to EMA definitions, is the ability of the bioanalytical method to measure and differentiate the analyte(s) of interest in the presence of components which may be expected to be present in the sample (EMA, 2011). Six *C. aspersum* blank snails were individually processed and analyzed.

Carry over was assessed by calculating it as the percent response in the matrix extract compared to the response in the preceding upper limit of quantification (ULOQ) 6 µg/ml. Five injections of ULOQ were alternated with five injections of blank samples.

Accuracy and precision

Control samples were prepared separately at concentrations of 0.05, 0.08, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 4.0, and 5.0 µg/ml in order to assess accuracy and precision. The accuracy of the method based on within-run was determined by performing five injections for each concentration. The between-run accuracy of the method was performed by processing three

runs (five samples per level) on three different days. Precision of the method was expressed as the coefficient of variation (%CV) of the back-calculated concentrations. Within-run precision and between-run precision were calculated with a minimum of 5 samples per concentration level.

Dilution integrity, Recovery and Stability

The method included the dilution of the matrix extract with methanol and this dilution should not affect the accuracy and precision. Dilution integrity was evaluated by means of five determinations of praziquantel in 0.8 µg/ml solution coming from 8 µg/ml and diluting 1:10 in methanol.

Recovery of praziquantel was estimated by calculating the matrix factor (the ratio of the peak area in the presence of biological matrix to the peak area measured with equivalent concentration in methanol %) for each individual determination. Replicate analysis of two sets of six samples at concentrations of 0.08 and 5.0 µg/ml praziquantel/matrix extract were performed.

Low QC 0.08 µg/ml and high QC 5.0 µg/ml concentrations were chosen for the stability studies. Spiked samples were prepared, aliquoted and stored both at room temperature and frozen (-20°C).

3.4. Publicación #4: Effect of praziquantel on the tegument and digestive epithelium ultrastructure of *Brachylaima* sp. metacercariae parasitizing the edible land snail *Cornu aspersum*

Tal y como se ha indicado en la introducción del presente documento y en la publicación #3, el praziquantel es el fármaco de elección para el tratamiento de las trematodosis, y su eficacia frente a metacercarias *Brachylaima* sp. parasitando *C. aspersum* (95%) ha sido demostrada según normativa VICH GL7.

En este trabajo se analizaron, mediante microscopía electrónica de rastreo (TEM), los efectos ultraestructurales del praziquantel en metacercarias recuperadas de *C. aspersum* tratados individualmente con 1'2 mgPZQ/caracol y 2'4 mgPZQ/caracol (Lote 1 y Lote 2 respectivamente) o tratados en grupo con la dosis de 2'4 mgPZQ/caracol *ad libitum* durante 7 días (Lote 3), siguiendo la misma metodología descrita en la publicación #3.

En el capítulo 1 del presente documento se ha realizado una breve descripción de la ultraestructura del tegumento y del aparato digestivo de los trematodos en general y de los efectos producidos por la acción del praziquantel en distintas especies.

Metacercarias *Brachylaima* spp. recuperadas del grupo *C. aspersum* control

En las metacercarias *Brachylaima* spp. recuperadas del grupo control, se observó un glicocálix extenso y regular recubriendo el cuerpo a excepción de la ventosa oral. Bajo el glicocálix, se halló el sincitio tegumentario, cuya estructura y organización coincidió con las descripciones generales de los trematodos realizadas en el capítulo 1, conteniendo inclusiones tegumentarias T2, según la nomenclatura de Smyth y Halton (1983). Estas inclusiones tegumentarias T2, de apariencia discoidal, ya habían sido descritas por Ferrer y cols. (2001) y se encontraron a lo largo del tegumento con una orientación característica, casi siempre en perfil medio-sagital y transversal con una disposición perpendicular al llegar al extremo apical del tegumento, sugiriendo que podrían tener como función el mantenimiento de éste (Fairweather y cols., 1999; Gonçalves y cols., 2013).

La presencia de lisosomas se encontró mayoritariamente en la zona basal del tegumento, así como las mitocondrias, fácilmente identificables por su estructura ovoide con contenido moderadamente electrodenso, aunque en los casos controles no pudieron observarse las crestas. Bajo el sincitio se observó una lámina basal patente sobre una capa de material fibroso intersticial con fibras bien definidas. Y, bajo el tegumento, se identificaron capas musculares tanto de tipo circular como longitudinal.

Resultados

El epitelio digestivo, formado por células epiteliales nucleadas, se encontró sobre una lámina basal sobre potentes capas musculares de tipo circular y longitudinal.

El epitelio digestivo, formado por células epiteliales nucleadas, se encontró sobre una lámina basal y, ésta, sobre potentes capas musculares de tipo circular y longitudinal. La presencia de mitocondrias, fácilmente identificables por sus crestas características, fue abundante a lo largo del citoplasma. Así como la presencia de vacuolas digestivas de gran tamaño. Las proyecciones de microvili de las células digestivas se observaron laxamente dispuestas en el lumen, tanto los microvili como la superficie de las células digestivas presentaron un glicocálix granuloso patente.

Metacercarias *Brachylaima* spp. recuperadas de los grupos de *C. aspersum* tratados con praziquantel

Tanto en el grupo de metacercarias recuperadas de caracoles tratados individualmente (Lote 1 y Lote 2) como en el de metacercarias recuperadas de caracoles tratados en grupo (Lote 3), las inclusiones tegumentarias T2 se observaron totalmente alteradas, degenerando de un alto contenido electrodenso a bajo contenido electrodenso, perdiendo su apariencia uniforme y acúmulos electrodensos repartidos alrededor de la periferia de la vesícula y separados por espacios poco electrodensos. Asimismo, pudo identificarse un estado intermedio de las inclusiones tegumentarias T2 en la que la degeneración no fue tan patente. La importancia de este hallazgo, dio fuerza a la propuesta de Ferrer y cols. (2001) en la que sugería que los lisosomas secundarios procedían de la digestión de las inclusiones tegumentarias T2, al contrario de lo que defendía Mattison y cols. (1994) que atribuía la presencia de estos lisosomas a la digestión de mitocondrias.

En ambas metacercarias, recuperadas o bien del grupo de caracoles tratado individualmente o del grupo de caracoles tratado en grupo, la orientación característica de las inclusiones tegumentarias T2 mencionada en los controles se perdió completamente, encontrándose una mezcla de perfil medio-sagital y perfil donut. En la zona apical más externa del tegumento, las inclusiones tegumentarias T2 dejaron de alinearse perpendicularmente.

En las metacercarias recuperadas del grupo de caracoles de tratados individualmente, las mitocondrias se encontraron totalmente alteradas dando una apariencia hinchada y difícil de reconocer, además de hallarse en la zona apical en vez de la basal. El sincitio perdió su aspecto electrouniforme, observándose muchas zonas de baja electrodensidad a lo largo de

él. La lamina basal dejó de ser patente, perdiendo su definición, y las fibras del material intersticial fibroso subyacente, aparecieron totalmente desorganizadas perdiendo el carácter fibroso. En cambio, en las metacercarias recuperadas de los caracoles tratados en grupo, las mitocondrias, con las crestas características claramente visibles, se identificaron fácilmente, así como la lámina basal y el material intersticial fibroso subyacente. En ambos grupos, tanto de metacercarias recuperadas de caracoles tratados individualmente como en grupo, las capas de fibras musculares, circular y longitudinal, permanecieron inalteradas.

Las células tegumentarias también mostraron alteraciones, tanto de forma como de contenido, demostrando que la alteración de las inclusiones tegumentarias T2 ya proviene de este nivel y sugiriendo que el praziquantel altera la producción de estas inclusiones tegumentarias.

El sistema digestivo de las metacercarias recuperadas de caracoles tratados, tanto individualmente como en grupo, mostraron una contracción patente de los ciegos, tan severa que no pudo vislumbrarse el lumen. Las proyecciones de microvili también se encontraron muy contraídas de tal forma que estaban en contacto las unas con las otras. Sin embargo, el glicocálix alrededor del microvili permaneció inalterado.

EFFECT OF PRAZIQUANTEL ON THE TEGUMENT AND DIGESTIVE EPITHELIUM ULTRASTRUCTURE OF *BRACHYLAIMA* SP. METACERCARIAE PARASITIZING THE EDIBLE LAND SNAIL *CORNU ASPERSUM*

Laia Gállego and Mercedes Gracenea

Laboratory of Parasitology, Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Correspondence should be sent to: gracenea@ub.edu

ABSTRACT: The edible land snail *Cornu aspersum* (Pulmonata: Stylommatophora) acts as second intermediate host in the cycle of *Brachylaima* sp. trematode, harboring free metacercariae in its kidney. The ingestion of undercooked infected snails by humans allows metacercariae to develop to adult stage in the intestine, causing brachylaimiasis. Praziquantel (PZQ) is the drug of choice to treat trematodiasis and it is effective against *Brachylaima* sp. metacercariae. The objective of this work was to assess, by transmission electron microscopy (TEM), the ultrastructural changes produced on the tegument and gastrodermis of the *Brachylaima* metacercariae recovered from *C. aspersum* treated with PZQ in comparison with untreated ones. Snails naturally infected by *Brachylaima* sp. metacercariae were treated by PZQ both individually and in groups. Metacercariae recovered from treated and control snails were processed for TEM. The tegument of untreated metacercariae was covered by a regular and thick glycocalyx. The syncytial epithelium contained abundant T2 secretory bodies appearing as membrane-bound biconcave disk-vesicles with high electron-dense and uniform content. The T2 secretory bodies located along the external area of the syncytium were mainly arranged at right angles to the apical plasma membrane. In treated metacercariae, the content of the T2 secretory bodies appeared altered, degenerating from high to low electron density, losing its uniform appearance and forming high electron-dense accumulations scattered around the periphery of the vesicle and separated by low electron-dense spaces. The presence of clusters was detectable in the central area. The characteristic arrangement of the T2 secretory bodies observed in untreated metacercariae was lost in treated ones. Vesicles near the apical area of the tegument no longer maintained their arrangement perpendicular to the apical plasma membrane. The characteristic arrangement of T2 secretory bodies and mitochondria was lost. The T2 secretory bodies were also found altered in the tegumental cell bodies, suggesting that the alterations started at the production stage. Mitochondria were severely degenerated and located in the apical area of the tegument. The digestive system displayed a strong contraction, which included the disappearance of the intracecal lumen.

Brachylaima sp. is a parasitic trematode with a 3-host life cycle which includes a terrestrial gastropod snail (Pulmonata: Stylommatophora) as first intermediate host shedding cercariae and a second intermediate host, which can be the same terrestrial gastropod or another harboring metacercariae, and a vertebrate as definitive host (Yamaguti, 1975; Sirgel et al., 2012). The edible land snail *Cornu aspersum* (Pulmonata: Stylommatophora) acts as second intermediate host harboring free, unencysted *Brachylaima* sp. metacercariae within the kidney. Their morpho-anatomic characteristics allow the identification of the larvae at genus level (Yamaguti, 1971, 1975; Mas-Coma and Montoliu, 1986; Gracenea and González-Moreno, 2002; González-Moreno and Gracenea, 2006; Segade et al., 2011) and their differentiation from other genera within the family Brachylaimidae Joyeux and Foley, 1980. The ingestion of undercooked infected host snails by humans allows metacercariae to develop to adults in the intestine, causing brachylaimiasis (Butcher et al., 1996; Butcher, 1998; Meerburg et al., 2009). The main presenting symptoms are diarrhea, abdominal pain, anorexia, and weight loss or poor weight gain (Butcher, 2006).

Praziquantel (PZQ) is the drug of choice to treat trematodiasis because its effectiveness has furthermore been demonstrated in animals intended for human consumption (fish, goats, and ovine species) and in humans (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products [EMA], 1996; Johansen et al., 1996; Shirakashi et al., 2012). This anthelmintic is effective against trematodes such as *Clonorchis sinensis* (Xiao et al., 2011), *Echinostoma paraensei* (Gonçalves et al., 2013), *Schistosoma mansoni* (Riley and Chappell, 1990; Mattos et al., 2007), *Shistosoma japonicum*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Metagonimus*

yokogawai, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani*, and *Neodiplostomum seoulense* (Chai, 2013). Recently, Gállego and Gracenea (2015) have demonstrated its efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae parasitizing the edible snail *C. aspersum*. Despite its widespread use, the mechanism of action of PZQ remains unknown. PZQ produces a disruption of Ca^{2+} homeostasis, initiating a cascade of events, such as a sustained contraction of the worm musculature and vacuolization and disruption of the parasite tegument, which lead to the elimination of parasites from the host (Greenberg, 2006).

The tegument of trematodes consists of an outer, syncytial epithelium connected by cytoplasmic strands to nucleated portions of cytoplasm, termed tegumental cell bodies, located in the parenchyma. The syncytium is underlaid by a fibrous basal lamina and circular and longitudinal muscle layers. The syncytial matrix contains mitochondria, ribosomes, endoplasmic reticulum, Golgi complexes, secretory bodies, and other inclusions (Smyth and Halton, 1983).

The cecal wall of trematodes consists of a lining epithelium or gastrodermis, which is supported by a thin basal lamina and a layer of circular and longitudinal muscle fibers (Smyth and Halton, 1983). The gastrodermis can be syncytial or cellular, and its surface becomes considerably increased throughout microvilli or lamellae extending from the apical surface to the luminal intracecal space. A typical cell from the digestive tissue contains a large basal nucleus, ribosomes, mitochondria, abundant granular endoplasmic reticulum, membrane-bound secretory bodies, and Golgi complexes (Fried, 1997).

Electron microscopy has been used to study praziquantel effects on different trematodes. Scanning electron microscopy-observed main PZQ effects were blebbing along the trematode tegument, especially in the region of the oral and ventral suckers, and peeling of the tegument and formation of holes in adults of

Received 20 May 2016; revised 11 July 2016; accepted 21 July 2016.
DOI: 10.1645/16-65

Fibricola seoulensis (Byong-Seol et al., 1985; Lee, 1985), *P. westermanni* (Lee et al., 1987), *E. paraensei* (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013), *Schistosoma* spp. (Wang and Zhou, 1988; Awad and Probert, 1991; Jiraungkoorskul et al., 2005, 2006; Xiao et al., 2011; Reda et al., 2012), and *Cl. sinensis* (Qian et al., 1988). Spine retraction was described in adults of *E. paraensei* (peristomic collar) and in *P. westermanni*.

The observed transmission electron microscopy (TEM) main effect on the tegument of *S. mansoni*, *S. japonicum*, *Schistosoma magrebowiei*, *E. paraensei*, and *Cl. sinensis* adults was vacuolization (Qian et al., 1988; Wang and Zhou, 1988; Xiao et al., 1988; Awad and Probert, 1991; Gonçalves et al., 2013; El-Shabasy et al., 2015). Swelling was observed in the tegument and spines of *S. mansoni* as well as an increase of the tegumental secretory bodies (El-Shabasy et al., 2015). Additionally, mitochondrial degeneration was described in the tegument and subtegumental musculature of *S. japonicum*. A strong decrease in the number of secretory bodies was detected in *Schistosoma* spp. throughout an in vivo assay (Wang and Zhou, 1988; Xiao et al., 1988). In *S. magrebowiei*, swelling of the tegument and muscle damage were observed as well as vacuoles with floccular material (Awad and Probert, 1991). Swelling, mitochondrial degeneration, and the presence of vacuoles with floccular material were recorded in *E. paraensei* tegument as well as a decrease in the number of secretory bodies (Gonçalves et al., 2013). Mitochondrial degeneration and muscle damage were described in *Cl. sinensis* (Qian et al., 1988). Alterations in the gastrodermis were only mentioned in *S. mansoni* and *S. magrebowiei* (Awad and Probert, 1991; El-Shabasy et al., 2015).

The objective of this work is to assess by TEM the ultrastructural changes produced on the tegument and gastrodermis of the *Brachylaima* metacercariae recovered from the edible land snail *C. aspersum* treated with PZQ in comparison with the tegument and gastrodermis of the *Brachylaima* metacercariae recovered from untreated snails.

MATERIALS AND METHODS

Experimental specimens and in vivo assays

Treatment of *C. aspersum* (= *Helix aspersa*) specimens was developed as described by Gállego and Gracena (2015). Briefly, *C. aspersum* specimens (n = 400) naturally infected by *Brachylaima* sp. metacercariae were distributed among 3 lots. Specimens from each of Lot 1 (n = 100) and Lot 2 (n = 100) were divided into a control group (n = 50) and a treatment group (n = 50). Snails in both groups were placed individually in plastic boxes (23 × 13 × 8 cm) covered with a net, maintained at room temperature (mean 21.3 °C ± 0.7, relative humidity 33.9 ± 6.0) under a natural light:dark cycle, and sprayed with tap water twice a day.

Specimens in the treatment group of Lot 1 and Lot 2 were individually fed with 1.2 mg PZQ and 2.4 mg PZQ, respectively, by means of snail food (provided by the Spanish Association for Breeding and Rearing Snails, ANCEC) mixed with PZQ (Fagron Iberica, S.A.U., Terrassa, Spain, L13080026, 101.0/pure). Snail food was dispensed on a small plastic plate (8.5 × 7.0 cm) inside each box on the first day of the assay. Each specimen was maintained in the box until the food was finished, and then the specimen was analyzed and any live metacercariae processed for TEM (Gállego and Gracena, 2015).

Specimens in Lot 3 (n = 200) were distributed between a control group (n = 100) and a treatment group (n = 100). Snails in both groups were placed in plastic boxes (23 × 13 × 8 cm) containing 10 specimens/box and maintained under the same conditions as Lots 1 and 2. Specimens in the treatment group of Lot 3 were group-treated with 2.4 mg PZQ/snail by means of snail food mixed with PZQ. Each day along the 7 days of the assay, 2 g of PZQ-supplemented snail food were dispersed on a small plastic plate (8.5 × 7.0 cm) inside each box in the treatment group (Gállego

and Gracena, 2015). After finishing the assay, specimens were analyzed and the live recovered metacercariae were processed for TEM.

Control groups in Lots 1, 2, and 3 were maintained under the same laboratory conditions as treatment groups and were fed with snail food without PZQ.

The kidney in treated and control snails was examined under a binocular stereomicroscope Leica MZ6 (Leica Microsystems [Schweiz] AG, Heerbrugg, Switzerland) and metacercariae were identified and counted (Gracena and González-Moreno, 2002).

Sample processing for TEM

Metacercariae recovered from treated and control snails were processed for TEM with routine fixation in 2.5% (v/v) glutaraldehyde plus 2.0% (w/v) paraformaldehyde buffered with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2–7.4) for 24 hr at 4 °C. After a wash with the same buffer, the specimens were postfixed with buffered 1% OsO₄ and 0.8% K₄[Fe(CN)₆] for 2 hr at 4 °C and again washed in the same buffer. Samples were dehydrated through an acetone series and embedded in EPON12 resin. Before ultrathin sections were cut, semithin sections (1 μm) were made and stained with 1% methylene blue-borax to select appropriate areas for TEM observations. The ultrathin sections were obtained using a Reichert-Omu ultra microtome with a diamond knife (Leica Microsystems [Schweiz] AG). The sections were collected on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963).

RESULTS

Control metacercariae recovered from untreated infected C. aspersum: The tegument of untreated *Brachylaima* metacercariae was covered by a regular and thick glycocalyx except for the oral sucker. Beneath the glycocalyx lay the syncytial epithelium, which compromises an outer, anucleate layer of cytoplasm connected with deep cytons by cytoplasmic bridges. The syncytial epithelium contained abundant T2 secretory bodies, according to Smyth and Halton (1983) nomenclature, which appeared as membrane-bound biconcave disk-vesicles with high electron-dense and uniform content (Fig. 1). T2 secretory bodies were found along the entire syncytial tegument with a characteristic orientation, offering mostly a mid-sagittal profile in cross-cutting and the appearance of dumbbells (Fig. 1B–D). Other minor orientations appeared such as a doughnut-shaped profile or transverse profiles (Fig. 1A). Those located along the most-external area of the syncytium were mainly arranged at right angles to the apical plasma membrane (Fig. 1E). The presence of secondary lysosomes with low electron-dense content was common at the basal area and in the middle region of the tegument (Figs. 1A, 2A, C). Mitochondria were abundant, and they rested mainly at the bottom of the syncytial epithelium (Fig. 1A). They could be identified as big ovoid structures, variable in size, with a mild electron-dense content and non-conspicuous cristae (Fig. 2B). Beneath the syncytium, a thick basal lamina was apparent, lying over a layer of fibrous interstitial material with well-defined fibers. The outer muscular layer was evident beneath the tegument (Fig. 2D).

The digestive epithelium was formed by nucleated epithelial cells lying over a thin basal lamina. Strong muscular, circular and longitudinal, layers underlaid them. The nucleus in epithelial cells included a patent nucleolus (Fig. 3A–C). Mitochondria were abundant in the cytoplasm, presenting well-formed cristae and electron-dense content (Fig. 3B, C, E–G). Big-sized digestive vacuoles were abundant in the digestive cells, which projected abundant microvilli loosely disposed toward the luminal space (DV, Fig. 3A, F). Both microvilli and the luminal surface of the digestive cells appeared covered by a patent granule glycocalyx

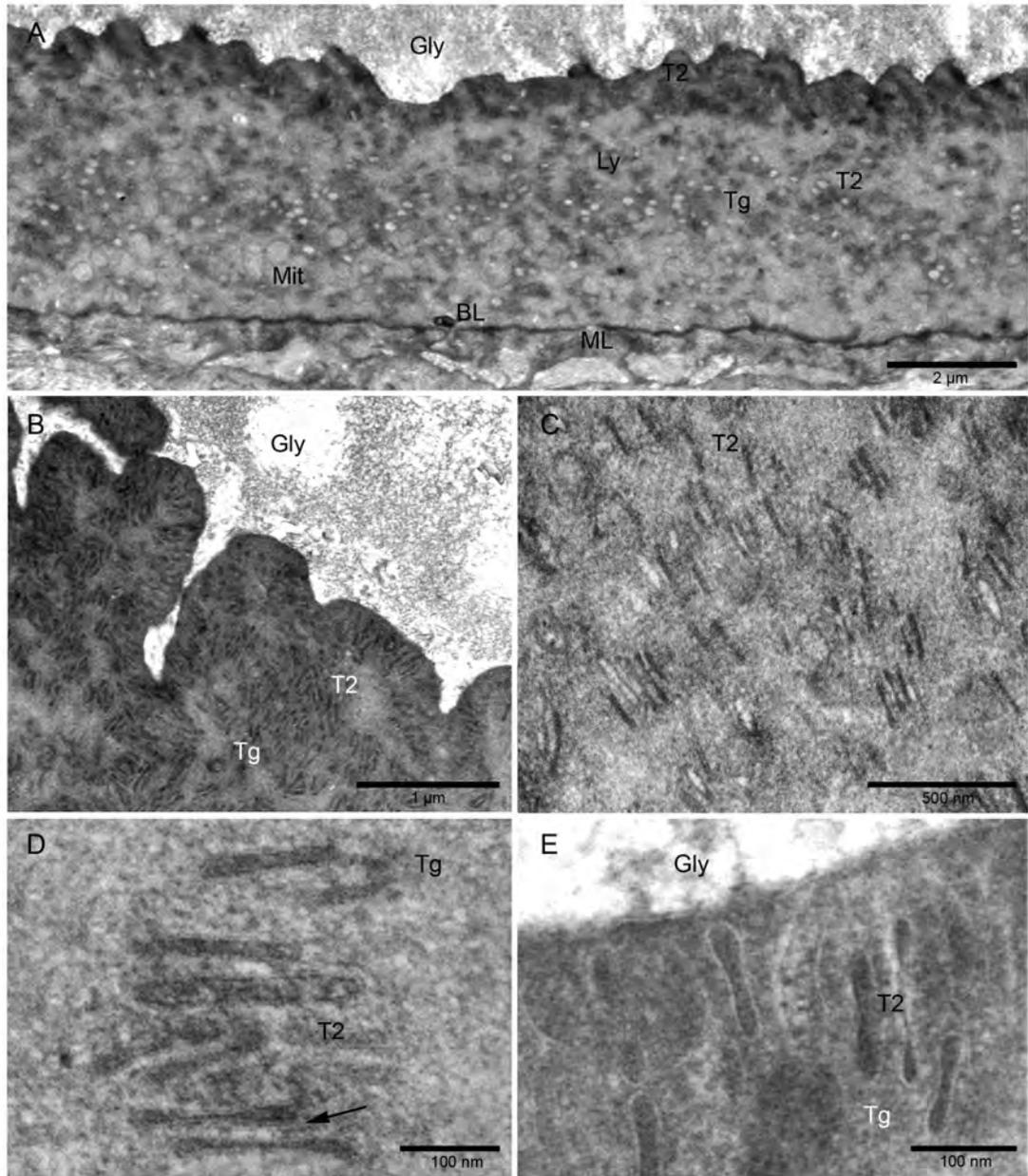


FIGURE 1. Transmission electron micrographs of the tegument of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* control group. Apical region. (A) Tegument. (B) Higher magnification of tegument apical area. (C) Higher magnification of tegument apical area. (D) Higher magnification of the tegument apical area; T2 membrane (arrow). (E) Perpendicular arrangement of T2 secretory bodies in the apical area. Abbreviations: Basal layer (BL), glycocalyx (Gly), lysosomes (Ly), mitochondria (Mit), muscle layer (ML), tegument (Tg), T2 secretory bodies (T2).

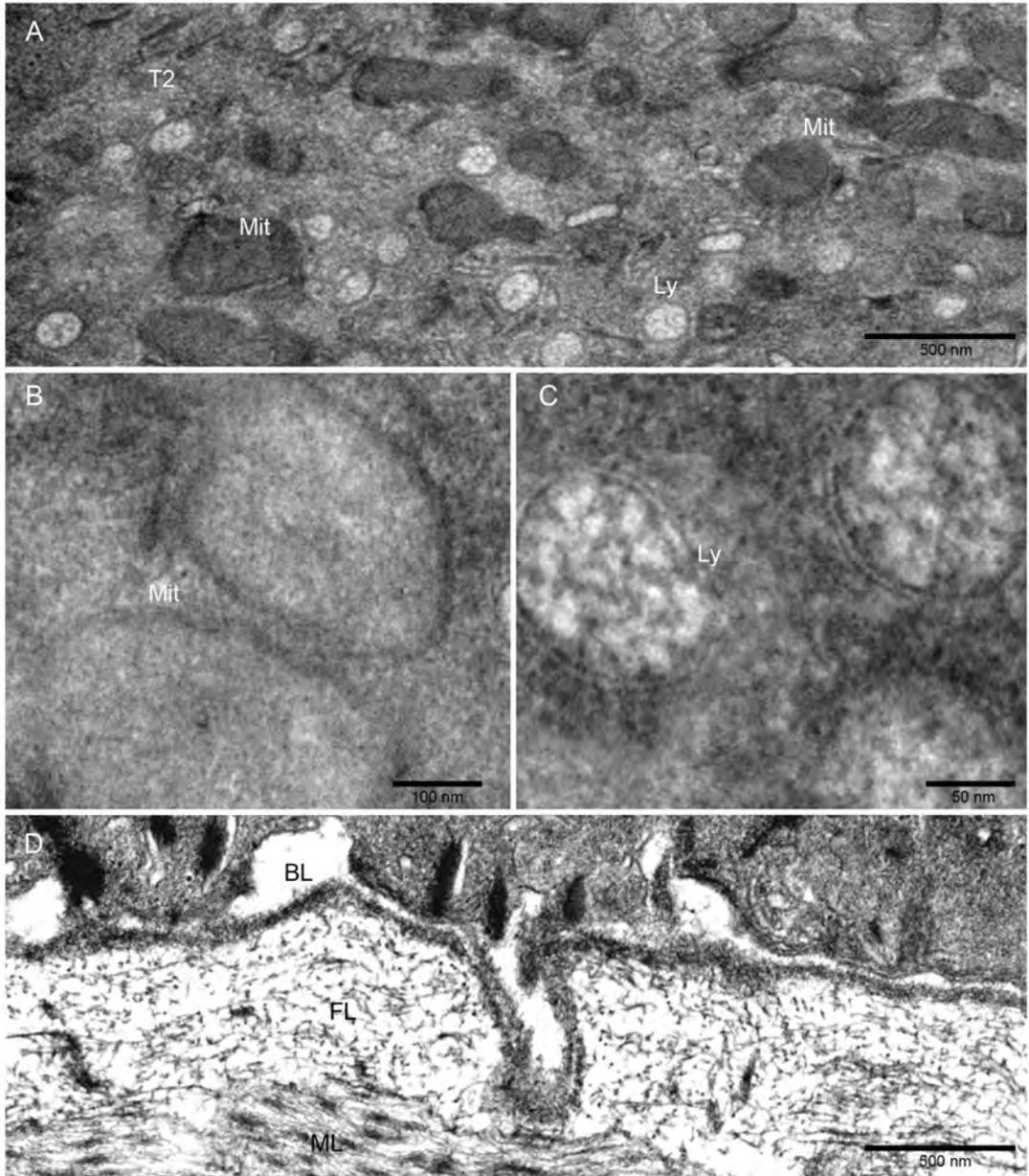


FIGURE 2. Transmission electron micrographs of the tegument of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* control group. Medium-basal region. (A) Tegument. (B) Detail of mitochondria. (C) Lysosome detail. (D) Higher magnification of tegument basal region. Abbreviations: Basal layer (BL), fibrous layer (FL), lysosomes (Ly), mitochondria (Mit), muscle layer (ML), T2 secretory bodies (T2).

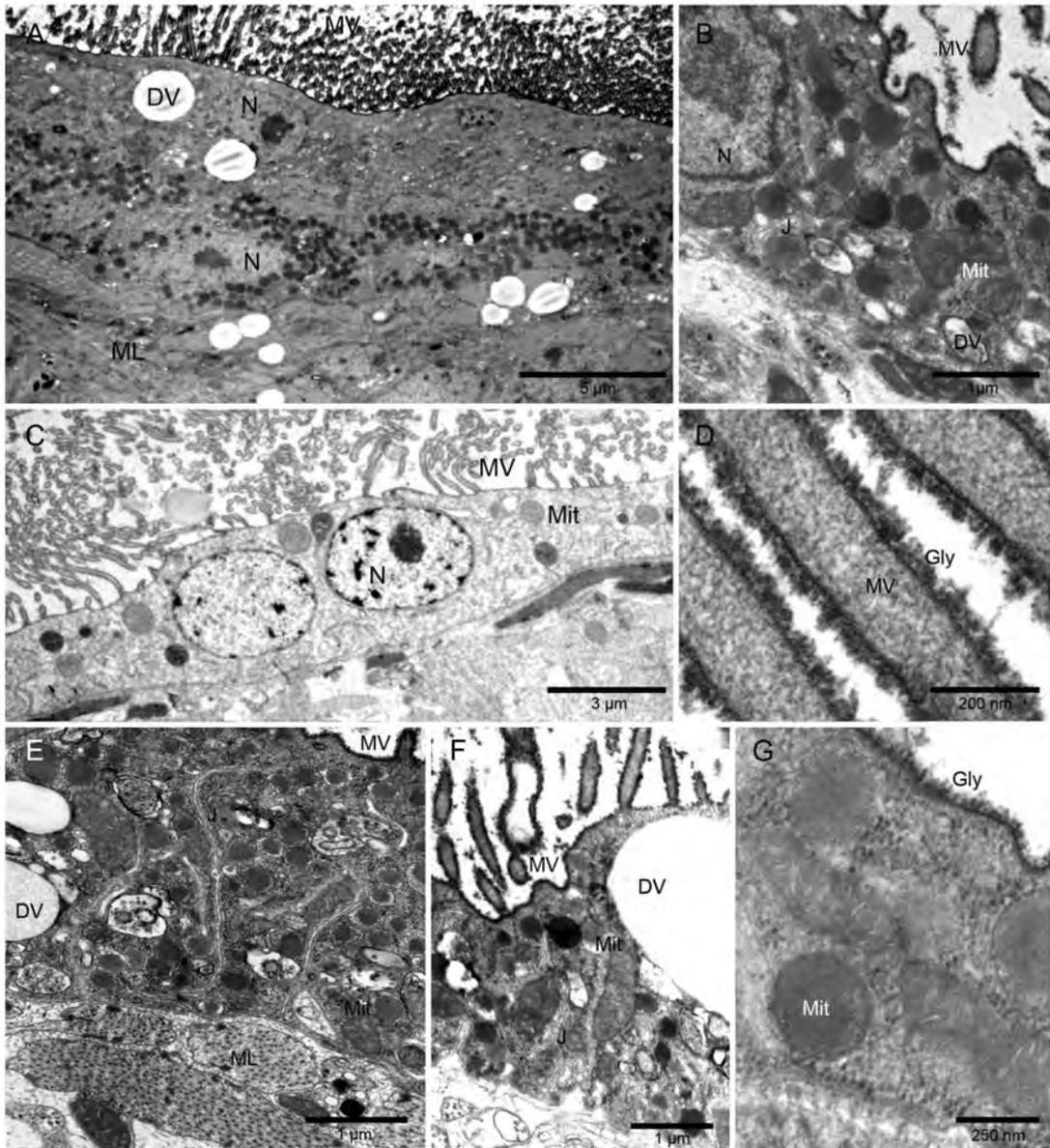


FIGURE 3. Transmission electron micrographs of the digestive epithelium of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* control group (without treatment). (A) Digestive epithelium. (B) Digestive vacuole detail. (C) Digestive epithelium. (D) Microvilli detail. (E) Higher magnification of the digestive epithelium. (F) Higher magnification of the digestive epithelium. (G) Higher magnification of the digestive epithelium. Abbreviations: Cell junction (J), digestive vacuole (DV), glycocalyx (Gly), microvilli (MV), mitochondria (Mit), muscle layer (ML), nucleus (N).

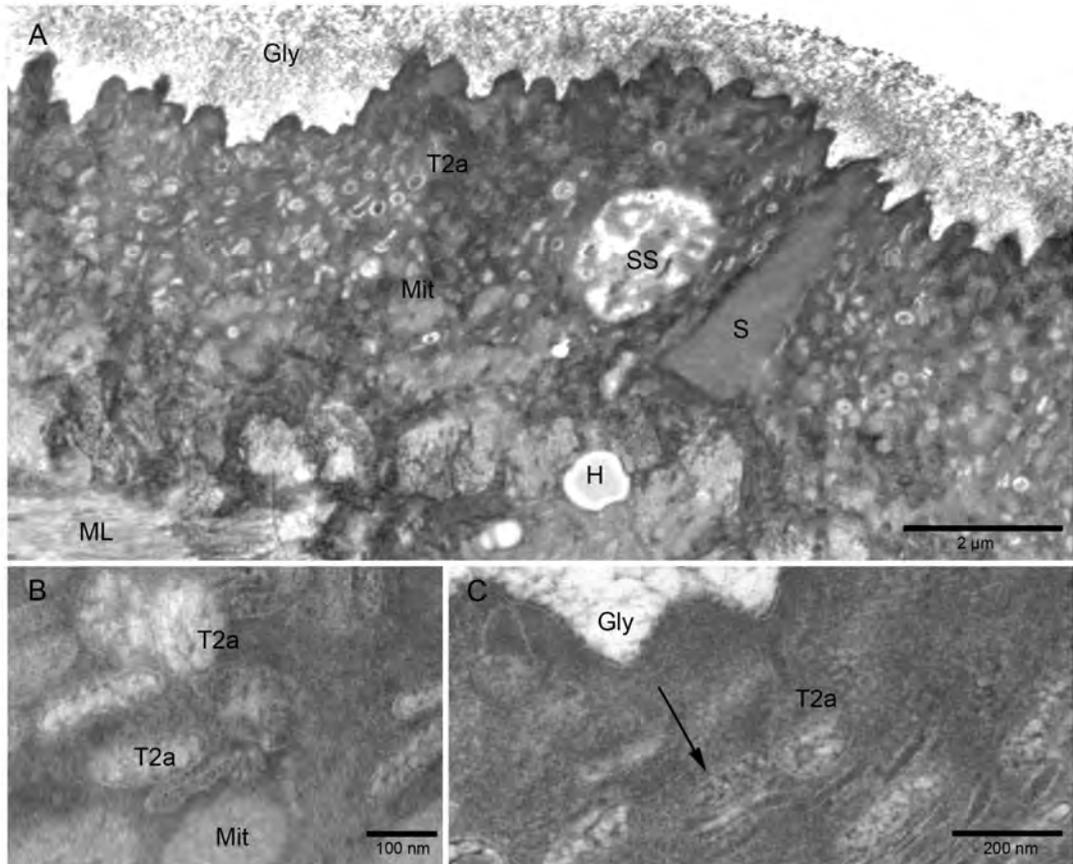


FIGURE 4. Transmission electron micrographs of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* individual treatment (1.2 mg PZQ/snail); apical region. (A) Tegument. (B) Higher magnification of tegument apical region. (C) Higher magnification of tegument apical region. Characteristic orientation of the T2 secretory bodies is altered (arrow). Abbreviations: Glycocalyx (Gly), hole (H), mitochondria (Mit), muscle layer (ML), surface sensor (SS), spine (S), T2 secretory bodies altered (T2a).

(Fig. 3D). Small vacuoles could also be found (Fig. 3B). Digestive inclusions could be found in the lumen of the cecum as well (Fig. 3B).

Metacercariae recovered from treated infected C. aspersum (individually treated 1.2 mg PZQ/snail, Lot 1): The tegument of metacercariae from individually treated snails showed a thick glycocalyx, as did the control ones (Fig. 4A). The T2 secretory bodies were still recognizable and membrane-bound, but their appearance was drastically changed. The content of the T2 secretory bodies appeared altered, degenerating from high electron density content to low electron density content (Figs. 4–6). This content lost its uniform appearance, and it formed high electron-dense accumulations scattered around the periphery of the vesicle and separated by low electron-dense spaces (Figs. 5A, 6C, D). The central area of the vesicle remained electron-dense and uniform in content in some vesicles.

However, the presence of clusters was detectable in the central area of most vesicles (Fig. 6C). The characteristic arrangement of the T2 secretory bodies observed in untreated metacercariae became lost in treated ones (Fig. 4C). Instead of finding almost all the T2 secretory bodies in mid-sagittal profile, an extensive mixture of mid-sagittal profiles, doughnut-shaped profiles, and transverse profiles were observed in treated metacercariae, showing that the characteristic orientation of the T2 secretory bodies was disrupted (Figs. 5A, 6C). Moreover, vesicles near the apical area of the tegument no longer maintained their arrangement perpendicular to the apical plasma membrane (Fig. 4C).

Mitochondria were severely degenerated; they were difficult to recognize, as cristae were not detected in metacercariae from individually treated snails (Figs. 4B, 5A, B). Mitochondria were found in the apical area of the tegument instead of the basal area

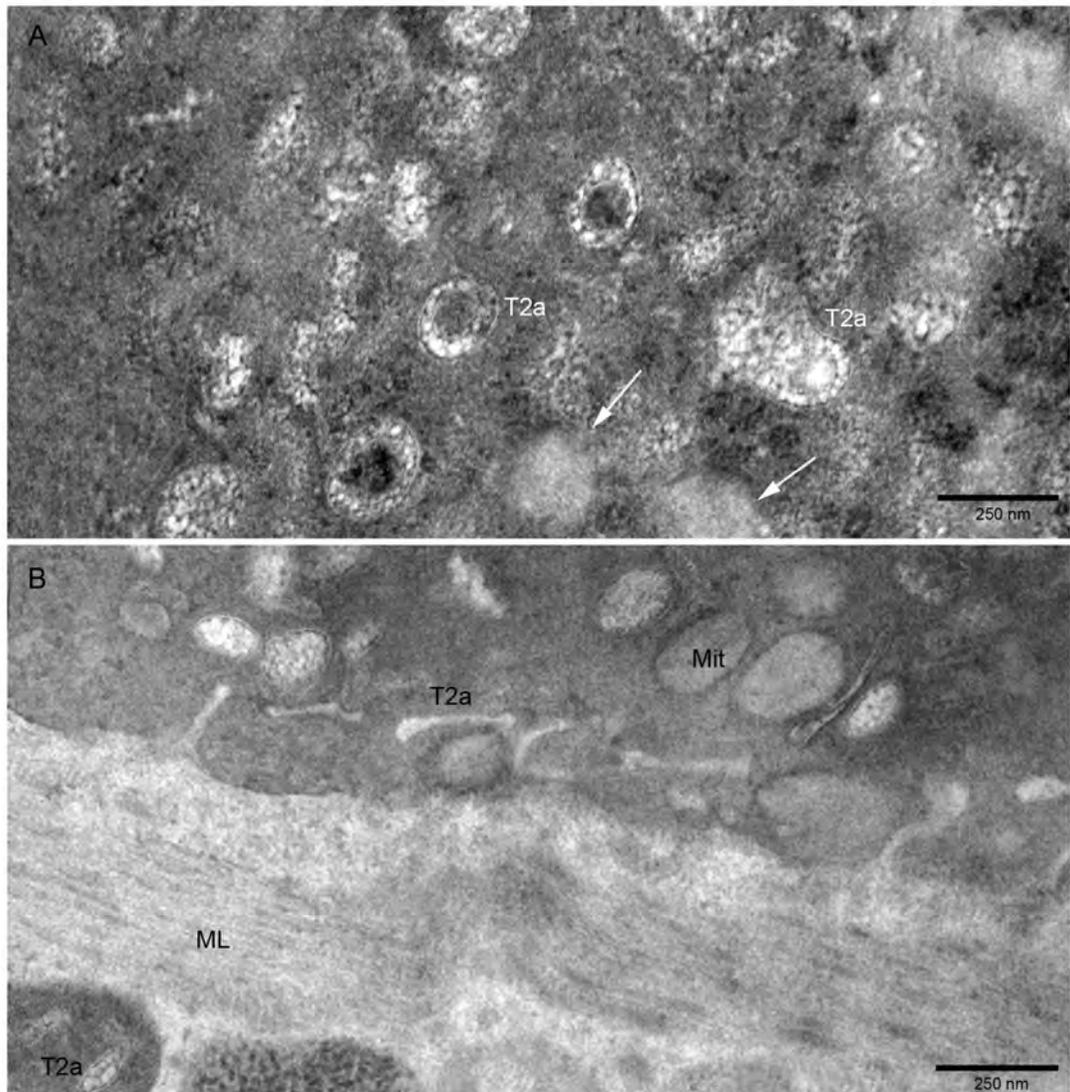


FIGURE 5. Transmission electron micrographs of the tegument of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* individual treatment (1.2 mg PZQ/snail). Medium-basal region. (A) Higher magnification of tegument medium area; mitochondria (arrows). (B) Higher magnification of tegument basal area. Abbreviations: Mitochondria (Mit), muscle layer (ML), T2 Secretory bodies altered (T2a).

(Fig. 4A). The syncytial epithelium showed low electron-dense areas (Fig. 4A).

Beneath the syncytium, the basal lamina was neither any longer apparent nor well defined in metacercariae from individually treated snails. The fibers of the subjacent fibrous interstitial material appeared highly disorganized and their fibrous character was lost (Fig. 5B).

Alterations in T2 secretory bodies were also found in the tegumental cell bodies at different damage level (Fig. 7). Scattered electron-dense accumulations separated by low electron-dense spaces appeared (Fig. 7A), suggesting that the alterations started at the T2 secretory bodies production stage in the tegumental cell body and not only in the syncytial tegument of the trematode. Alterations in the shape were also found; T2 secretory bodies

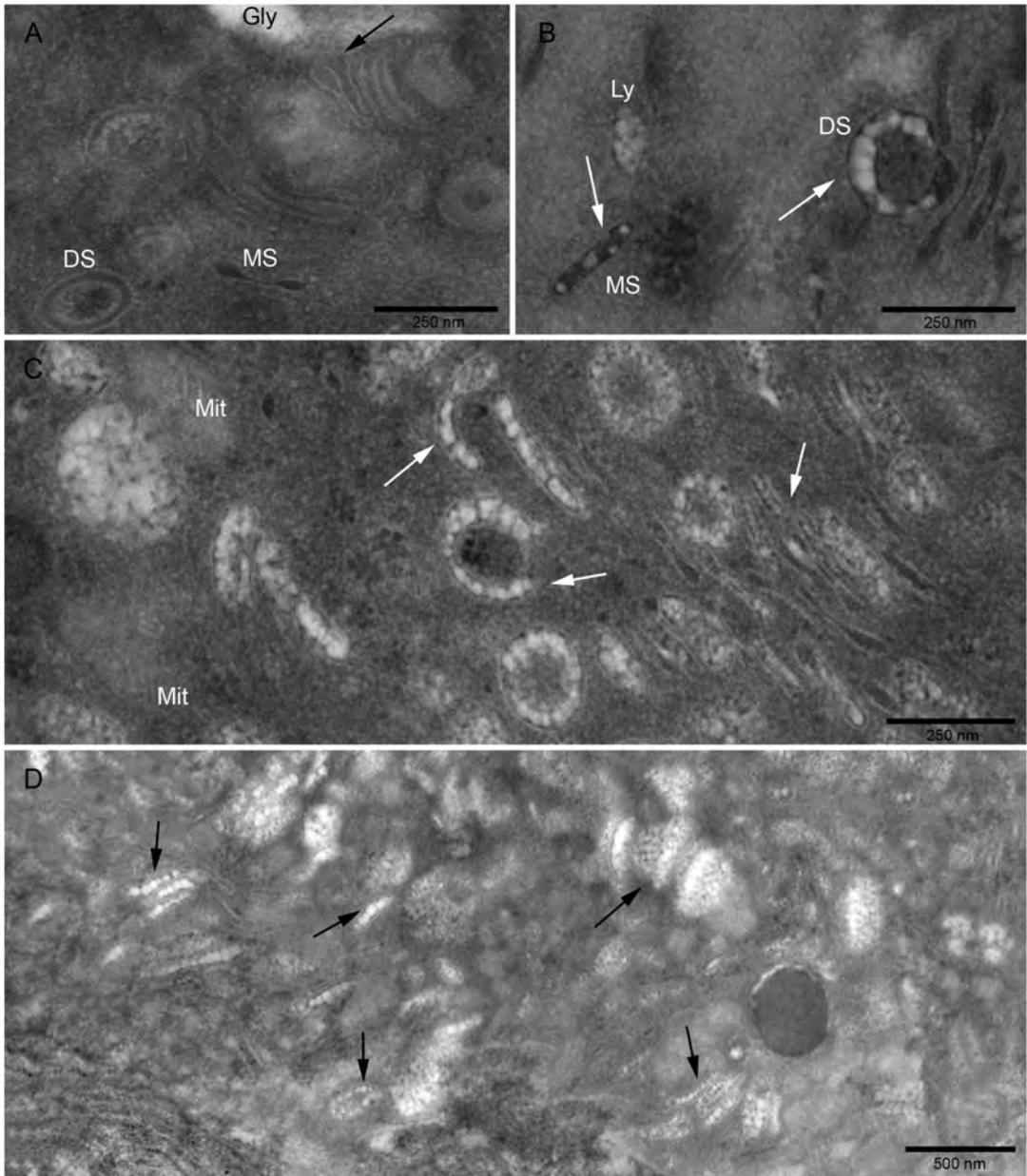


FIGURE 6. Transmission electron micrographs of the T2 secretory bodies of *Brachylaima* sp. of metacercariae from *Cornu aspersum*. (A) Control group. T2 secretory bodies' arrangement in the apical area (Arrow). (B) Treatment group (2.4 mg PZQ/snail, 10 specimens/box). Intermedium alterations in the electron density content (arrows). (C) Treatment group (1.2 mg PZQ/snail, individual treatment). T2 secretory bodies altered in the medium region (arrows). (D) Treatment group (1.2 mg PZQ/snail, individual treatment). T2 secretory bodies altered located at the basal region (arrows). Abbreviations: Doughnut-shaped T2 secretory bodies (DS), glycofocalyx (Gly), lysosomes (Ly), mid-sagittal profile T2 secretory bodies (MS), mitochondria (Mit).

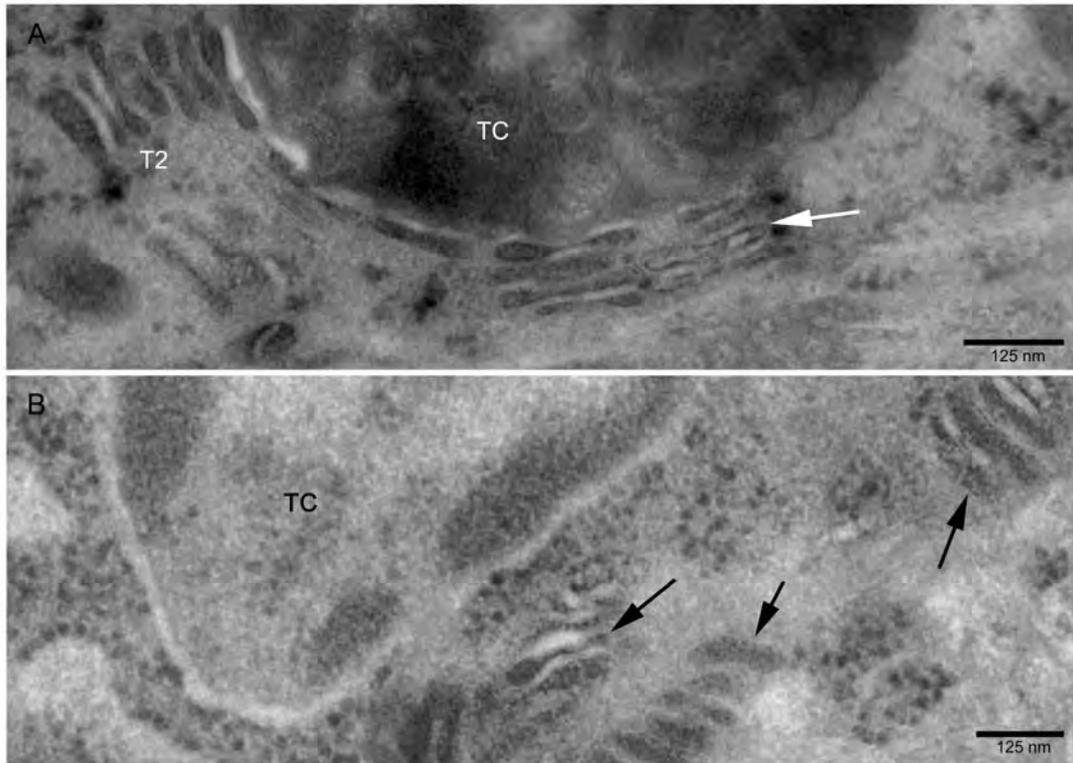


FIGURE 7. Transmission electron micrographs of the tegumental cell of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* individual treatment (1.2 mg PZQ/snail). (A) Altered T2 secretory bodies in the cytoplasm of the cell (arrow). (B) Altered T2 secretory bodies in the cytoplasm of the tegumental cell (arrows). Abbreviations: Tegumental cell (TC), T2 secretory bodies (T2).

presented a deformed or irregular and elongated aspect (Fig. 7B), losing the discoid characteristic appearance previously described in the control samples.

The digestive system of the treated metacercariae displayed a strong contraction of the ceca, the severity of which induced the disappearance of the intracecal lumen (Fig. 8). The microvilli projecting from the digestive epithelium appeared strongly packed, in close contact one with each other. The layer of glycocalyx surrounding the microvilli was maintained (Fig. 8).

Metacercariae recovered from treated infected C. aspersum (individually treated 2.4 mg PZQ/snail, Lot 2): Alterations found in this group were similar to that in individually treated 1.2 mg PZQ/snail and are well described in the previous section as well as in the corresponding figures.

Metacercariae recovered from treated infected C. aspersum (group treated 2.4 mg PZQ/snail, Lot 3): Alterations found in this group were similar to that in individually treated 1.2 mg PZQ/snail. The only remarkable finding was an intermediate state in the T2 secretory bodies degeneration in which mild electron-density content appeared and cluster formation was not as strong as in metacercariae from individually treated snails (white) (Fig. 6B).

DISCUSSION

The trematode tegument is a metabolically active layer specialized in the absorption of nutrients, the synthesis and secretion of materials, osmoregulation, excretion, and a sensory role. The tegumental pattern of *Brachylaima* sp. metacercariae recovered from untreated snails follows the characteristic architecture of the adult digenean tegument (Smyth and Halton, 1983; Threadgold, 1984) and is similar to other *Brachylaima* spp. such as *Brachylaima fuscatus* and *Brachylaima aequans* (Zdarska et al., 1991; Zdarska, 1994) and to metacercariae from other species such as *Leucochloridiomorpha constantinae* (Harris et al., 1974), *Timoniella imbutiforme* (El-Darsh and Whitfield, 2000), *Zygocotyle lunata* (Irwin et al., 1991), and *Diplostomum phoxini* (Bibby and Rees, 1971). Smyth and Halton (1983) proposed up to 3 types of tegumental inclusions in adult trematodes: T1 secretory bodies (high density bodies) and T2 secretory bodies (biconcave disk-vesicles) were both described in *Fasciola hepatica* (Bennett and Threadgold, 1973), and a third type of inclusion, named the multilaminar vesicle (Smyth and Halton, 1983), was described in *Schistosoma* (Morris and Threadgold, 1968; Silk et al., 1969; Hockley and McLaren, 1973).

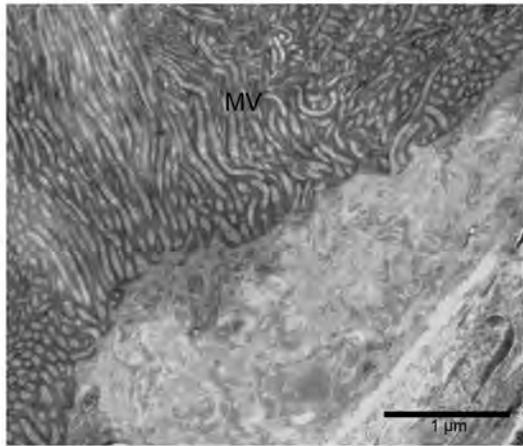


FIGURE 8. Transmission electron micrographs of the digestive epithelium of *Brachylaima* sp. metacercariae from *Cornu aspersum* individual treatment (1.2 mg PZQ/snail). Abbreviations: Microvilli strongly packed (MV).

Only T2 secretory bodies were found in *Brachylaima* sp. metacercariae (Zdarska, 1994; Ferrer et al., 2001), as well as in the adult stage of *B. aequans* (Zdarska et al., 1991), *F. hepatica* (Bennett and Threadgold, 1973), *E. paraensei* (Gonçalves et al., 2013), *Halipagus ovocaudatus* (Kechemir, 1978), and *Postorchigenes gymnesicus* (Ferrer et al., 1996). T2 secretory bodies were also detected in metacercariae of *D. phoxini*, named “dense secretion bodies” (Bibby and Rees, 1971), and in *L. constantinae* (Harris et al., 1974), *Z. lunata* (Irwin et al., 1991), or *T. imbutiforme*, named “Type III secretory body” (El-Darsh and Whitfield, 2000).

T2 bodies appeared strongly altered in treated *Brachylaima* sp. metacercariae, and the alteration has been extensively described for the first time in this present work. They maintained their membrane-bound character but their content became deeply changed from a continuous to a highly discontinuous appearance. The content formed high electron-dense accumulations progressively invading the entire body from the periphery to the central region. Also, the arrangement of the T2 secretory bodies appeared altered, and the orientation perpendicular to the tegumental plasmatic membrane was no longer observed. These changes have, most likely, an important influence on the function of the T2 bodies because one of the functions attributed to T2 bodies, that of maintenance of the tegumental syncytium (Fairweather et al., 1999; Gonçalves et al., 2013), could be strongly distressed by PZQ. Hanna (1980a, 1980b, 1980c) and MacGregor et al. (1988) suggested that the T2 bodies contribute to the formation of the glycocalyx and the apical membrane of the tegument as well as to the immunoprotection of the trematodes. Nevertheless, the glycocalyx was not significantly altered in treated metacercariae, as was expected if the T2 content was implied in its maintenance. Gonçalves et al. (2013) concluded that T2 secretory bodies seem to lose their content and were damaged and fragmented in the tegument of *E. paraensei* adults extracted from the intestine of hamsters treated with PZQ. However, figures provided by those

authors were not clear enough to compare with those in the present work, and no exact similarities or differences could be definitively established. Those authors also indicated that the number of unaltered T2 bodies decreased, and this assertion was in accordance with our findings. In contrast, El-Shabasy et al. (2015) found an increase of membranous whorls (named S1 secretory bodies and defined as round, electron-lucent secretory bodies) and T2 secretory bodies in adults of *S. mansoni*, but they used a sub-therapeutic dose of PZQ (Table I).

Ferrer et al. (2001) described the presence of few lysosomes in untreated *Brachylaima* sp. and attributed them to an intrategumental digestion of T2 secretory bodies. Accordingly, the increase of secondary lysosomes observed in treated metacercariae in the present work suggests that they could have originated by digestion of the degenerated T2 secretory bodies. In contrast, Mattison et al. (1994) claimed that the secondary lysosomes were the product of mitochondria digestion in paramphistosomes.

Vacuolization and mitochondria degeneration observed in treated *Brachylaima* sp. metacercariae were common PZQ-induced effects, also reported in adults of *E. paraensei* (Gonçalves et al., 2013), *S. margrebowiei* (Awad and Probert, 1991), *S. japonicum* (Wang and Zhou, 1988; Xiao et al., 1988), and *Cl. sinensis* (Qian et al., 1988), among others (Table I). Swelling was described in *E. paraensei* and *Schistosoma* sp., but in the present study this phenomenon was not observed.

Damage in subtegumental musculature was described in adults of *Cl. sinensis* and *Schistosoma* sp. as a PZQ effect (Xiao et al., 1988; Awad and Probert, 1991; El-Shabasy et al., 2015). However, in the present study muscle tissue remained unaffected as well as in other trematodes such as *E. paraensei* (Gonçalves et al., 2013).

The digestive epithelium performs secretory and absorptive activities in trematodes (Fried, 1997). *Brachylaima* sp. metacercariae have a closed digestive system. Ceca are lined by an epithelium lying on a thin basal lamina supported by a strong circular and longitudinal musculature. Abundant microvilli emerge from the apical surface of the gastrodermis, projecting to the cecal lumen (Fried, 1997; González-Moreno and Gracena, 2006). In the present work, the gastrodermis is cellular and with no syncytium as described in *B. aequans* (Zdarska et al., 1988).

The major effect of PZQ observed by TEM over the digestive epithelium of *Brachylaima* sp. metacercariae, i.e., the strong contraction of the subjacent musculature which induced the disappearance of the intracecal lumen and the packing of the microvilli, was also exactly reported by El-Shabasy et al. (2015) in adults of *S. mansoni*. Awad and Probert (1991) reported vacuolization of the gastrodermis in PZQ-treated *S. margrebowiei* adults, but this effect was not detected in *Brachylaima* sp. metacercariae.

Although PZQ was discovered in the 1970s and introduced for schistosomiasis treatment in the 1980s, its mechanism of action remains unknown (Greenberg, 2006). Recently, mass spectrometry imaging-based techniques helped to characterize the lipids in specific locations which are directly involved in the biochemical pathways of the BH strain of *S. mansoni*. PZQ may activate sphingolipid production in female adult worms and compromise the activity of (Na⁺/K⁺)-ATPase in male worms (Ferreira et al., 2015). Keiser (2010) remarked upon the need for development of new drugs for the treatment of food-borne trematodiasis, and Cioli et al. (2014) pointed out that the lack of

TABLE I. Transmission electron microscopy (TEM)-detected alterations in PZQ treatment of trematodes. Not mentioned (NM). Membranous whorls (MW).

TEM alterations in praziquantel-treated trematodes	Tegument				Gastrodermis		
	Vacuolization	Swelling	Mitochondrial degeneration	Vacuoles with floccular material	Muscle damage	Secretory bodies	Contraction of the subjacent musculature and vacuolization
<i>Schistosoma mansoni</i> (adult) in vivo (mice) El-Shabasy et al., 2015	+	+ tegument, spines	NM	NM	+	↑ (T2* and MW†)	+
<i>Echinostoma paraensei</i> (adult) in vivo (hamsters) Gonçalves et al., 2013	+	+ basal infolds in tegumental syncytium	+	+	-	↓ (T1 and T2)	NM
<i>Schistosoma murgeshowiei</i> (adult) in vivo (hamsters) Awad and Probert., 1991	+	+ tegumental syncytium	NM	+	+	MW appeared in the tegument	+
<i>Schistosoma japonicum</i> (schistosomula) in vivo (mice) Xiao et al., 1988	+	+ tegumental muscle	+	NM	+	MW ↓ in tegument	NM
<i>Schistosoma japonicum</i> (schistosomula) in vitro Wang and Zhou, 1988	+	NM	+	NM	NM	MW appeared in the tegument	NM
<i>Clonorchis sinensis</i> (adult) in vivo (rats) Qian et al., 1988	+	NM	+	NM	+	NM	NM

* According to El-Shabasy et al. (2015) S3 secretory bodies.

† According to El-Shabasy et al. (2015) S1 secretory bodies.

knowledge on the mechanism of action prevents the rational design of improved analogs. Also, the maintenance of trematode life cycles in the laboratory is complex because it requires at least 2 hosts (Keiser, 2010). In this scenario, *C. aspersum* and *Brachylaima* sp. metacercariae could have a potential role as a laboratory model to elucidate the mechanism of PZQ. *Brachylaima* sp. metacercariae are commonly found parasitizing the snail (Gracenea and González-Moreno, 2002; Segade et al., 2011; Gállego and Gracenea, 2015), and PZQ has been tested in vivo reaching 95% efficacy results through oral dosing in *C. aspersum* in a simple design (Gállego and Gracenea, 2015). This could allow acceleration of experiments because no cycle maintenance is needed and parasites are “ready to use” (prevalence up to 91% in marketplaces and up to 97% in farms [Segade et al., 2011; Gállego and Gracenea, 2015]). Additionally, another strong point for using the binomial *C. aspersum-Brachylaima* sp. is the intensity of the parasitization, since 50 metacercariae per specimen can be reached (Segade et al., 2011; Gállego and Gracenea, 2015), which will provide enough statistical power in advanced techniques like MALDI-MSI used in *S. mansoni* (Ferreira et al., 2015).

LITERATURE CITED

AWAD, A. H., AND A. J. PROBERT. 1991. The effect of praziquantel on the ultrastructure of *Schistosoma murgeshowiei*. *Journal of Helminthology* **65**: 79–88.

BENNETT, C. E., AND L. T. THREADGOLD. 1973. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XIII. Fine structure of the newly excysted juvenile. *Experimental Parasitology* **34**: 85–99.

BIBBY, M. C., AND G. REES. 1971. The ultrastructure of the epidermis and associated structures in the metacercaria cercaria and sporocyst of *Diplostomum phoxini* (Faust, 1918). *Zeitschrift für Parasitenkunde* **37**: 169–186.

BUTCHER, A. R. 1998. First report of the isolation of an adult worm of the genus *Brachylaima* (Digenea: Brachylaimidae) from the gastrointestinal tract of a human. *International Journal for Parasitology* **28**: 607–610.

BUTCHER, A. R. 2006. Review of thirteen cases of *Brachylaima cribbi* intestinal fluke worm infection in children and adults from South Australia. Annual Scientific Meeting Exhibition of the Australian Society for Microbiology (ASM 2006), Gold Coast Convention and Exhibition Centre, Queensland Australia. *Annals of the ACTM, a Journal of Tropical and Travel Medicine* **7**: 32–33.

BUTCHER, A. R., G. A. TALBOT, R. E. NORTON, M. D. KIRK, T. H. CRIBB, J. R. L. FORSYTH, B. KNIGHT, AND A. S. CAMERON. 1996. Locally acquired *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) intestinal fluke infection in two South Australian infants. *Medical Journal of Australia* **164**: 475–478.

BYONG-SEOL S., C. IN-JUNE, AND C. JONG-YIL. 1985. Studies on intestinal trematodes in Korea. XIX. Light and scanning electron microscopy of *Fibricola seoulensis* collected from albino rats treated with praziquantel. *Korean Journal of Parasitology* **23**: 47–57.

CHAI, J. Y. 2013. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: An update. *Journal of Infection and Chemotherapy* **5**: 32–43.

CIOLI, D., L. PICA-MATTOCCIA, A. BASSO, AND A. GUIDI. 2014. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? *Molecular and Biochemical Parasitology* **195**: 23–29. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.06.002

EL-DARSH, H. E. M., AND P. J. WHITFIELD. 2000. Ultrastructure of the tegument of the metacercaria of *Timoniella imbutiforme*. *Journal of Helminthology* **74**: 57–66.

EL-SHABASY, E. A., E. S. REDA, S. H. ABDEEN, A. E. SAID, AND A. OUHIT. 2015. Transmission electron microscopic observations on ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation attenuated vaccine and/or praziquantel in addition to passive immunization with normal and

- vaccinated rabbit sera against infection. *Parasitology Research* **114**: 1563–1580.
- EMA. 1996. Committee for veterinary medicinal products “praziquantel.” Summary report (1). EMEA/MRL/141/96-FINAL. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015784.pdf. Accessed 5 August 2015.
- FAIRWEATHER, I., L. T. THREADGOLD, AND R. E. B. HANNA. 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In *Fasciolosis*, J. P. Dalton (ed.). CAB International, Wallingford, U.K., p. 47–111.
- FERRAZ, J., J. SOUZA, M. COSTA-SILVA, E. TORRES, A. SANTANA, R. LANFREDI, A. MALDONADO, AND J. GARCIA. 2012. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitology Research* **111**: 143–148.
- FERREIRA, M. S., R. N. DE OLIVEIRA, D. N. DE OLIVEIRA, C. Z. ESTEVES, S. M. ALLEGRETTI, AND R. R. CATHARINO. 2015. Revealing praziquantel molecular targets using mass spectrometry imaging: An expeditious approach applied to *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **45**: 385–391.
- FERRER, J., O. GONZÁLEZ-MORENO, AND M. GRACENEA. 2001. Actin cytoskeleton in adults and metacercariae of *Brachylaima* sp. *Journal of Helminthology* **75**: 337–344.
- FERRER, J., M. GRACENEA, M. TRULLOLS, AND O. GONZÁLEZ-MORENO. 1996. Ultrastructural observations of the tegument of *Postorchigenes gymnesicus* (Digenea: Lecithodendriidae). *Journal of Helminthology* **70**: 13–19.
- FRIED, B. 1997. An overview of the biology of trematodes. In *Advances in trematode biology*, B. Fried and T. K. Graczyk (eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 1–30.
- GÁLLEGO, L., AND M. GRACENEA. 2015. Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae (Trematoda: Brachylaimidae) parasitizing the edible land snail *Cornu aspersum* and its HPLC-MS/MS residue determination. *Experimental Parasitology* **157**: 92–102.
- GONÇALVES, J. P., A. OLIVEIRA-MENEZES, A. JUNIOR MALDONADO, T. M. U. CARVALHO, AND W. DE SOUZA. 2013. Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Veterinary Parasitology* **194**: 16–25.
- GONZÁLEZ-MORENO, O., AND M. GRACENEA. 2006. Life cycle and description of a new species of Brachylaimid (Trematoda: Digenea) in Spain. *Journal of Parasitology* **92**: 1305–1312.
- GRACENEA, M., AND O. GONZÁLEZ-MORENO. 2002. Life cycle of *Brachylaima mascomai* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rats in the Llobregat Delta (Spain). *Journal of Parasitology* **88**: 124–133.
- GREENBERG, R. M. 2006. Praziquantel: Mechanism of action. In *Parasitic flatworms: Molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*, A.G. Maule and N. J. Marks (eds.). CAB International, Oxfordshire, U.K., p. 269–278.
- HANNA, R. E. B. 1980a. *Fasciola hepatica*: Glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology* **50**: 103–114.
- HANNA, R. E. B. 1980b. *Fasciola hepatica*: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Experimental Parasitology* **50**: 155–170.
- HANNA, R. E. B. 1980c. *Fasciola hepatica*: Autoradiography of protein synthesis, transport and secretion by the tegument. *Experimental Parasitology* **50**: 297–304.
- HARRIS, K. R., T. C. CHENG, AND A. CALL. 1974. An electron microscope study of the tegument of the metacercariae and adult of *Leucochloridium constantiae* (Trematoda: Brachylaimidae). *Parasitology* **64**: 245–252.
- HOCKLEY, D. J., AND D. J. McLAREN. 1973. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal for Parasitology* **3**: 13–25.
- IRWIN, S. W. B., T. J. J. McCLOUGHLIN, AND B. FRIED. 1991. Scanning and transmission electron microscopical observations on the tegument of excysted metacercariae and adults of *Zygoxyle lunata*. *Journal of Helminthology* **65**: 613–620.
- JIRAUNGKOORSKUL, W., S. SAHAPHONG, P. SOBHON, S. RIENGROJITAK, AND N. KANGWANRANGSAN. 2005. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitology International* **54**: 177–183.
- JIRAUNGKOORSKUL, W., S. SAHAPHONG, P. SOBHON, S. RIENGROJITAK, AND N. KANGWANRANGSAN. 2006. *Schistosoma mekongi*: The in vitro effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. *Experimental Parasitology* **113**: 16–23.
- JOHANSEN, M. V., J. MONRAD, AND N. Ø. CHRISTENSEN. 1996. Effects of praziquantel on experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. *Veterinary Parasitology* **62**: 83–91.
- KECHEMIR, N. 1978. Evolution ultrastructurale du tegument d'*Halipecus ovocaudatus* Vulpian, 1858 au cours de son cycle biologique. *Parasitology Research* **57**: 17–33.
- KEISER, J. 2010. In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology* **137**: 589–603.
- LEE, S. 1985. In vitro effects of praziquantel on *Fibricola seoulensis*. *Seoul Journal of Medicine* **26**: 41–51.
- LEE, S., H. PARK, S. HONG, J. CHAI, AND S. HONG. 1987. In vitro effect of praziquantel on *Paragonimus westermani* by light and scanning electron microscopic observation. *Korean Journal of Parasitology* **25**: 24–36.
- MACGREGOR, A. N., J. R. KUSEL, AND R. A. WILSON. 1988. Isolation and characterization of discoid granules from the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* **74**: 250–254.
- MAS-COMA, S., AND I. MONTOLIU. 1986. The life cycle of *Brachylaima ruminae* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rodents. *Parasitology Research* **72**: 739–753.
- MATTISON, R. G., R. E. B. HANNA, AND W. A. NIZAMI. 1994. Ultrastructure and histochemistry of the tegument of juvenile paramphistomes during migration in Indian ruminants. *Journal of Helminthology* **68**: 211–221.
- MATTOS, A. C. A., G. C. PEREIRA, L. JANNOTTI-PASSOS, J. R. KUSEL, AND P. M. Z. COELHO. 2007. Evaluation of the effect of oxamiquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* **102**: 84–91.
- MEERBURG, B. G., G. R. SINGLETON, AND A. KIJLSTRA. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* **35**: 221–270.
- MORRIS, G. P., AND L. T. THREADGOLD. 1968. Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **54**: 15–27.
- QIAN, M., Y. LIU, L. GUAN, AND X. WANG. 1988. Light and electron microscopic studies on the effects of 1-, d- and dl-praziquantel on *Clonorchis sinensis*. *Acta Pharmacologica Sinica* **9**: 457–460.
- REDA, E. S., A. OUHTIT, S. H. ABDEEN, AND E. A. EL-SHABASY. 2012. Structural changes of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation-attenuated vaccine and/or praziquantel against infection. *Parasitology Research* **110**: 979–992.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208–212.
- RILEY, E. M., AND L. H. CHAPPELL. 1990. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **101**: 211–217.
- SEGADE, P., C. CRESPO, N. GARCÍA, J. M. GARCÍA-ESTÉVEZ, C. ARIAS, AND R. IGLESIAS. 2011. *Brachylaima aspersae* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) infecting farmed snails in NW Spain: Morphology, life cycle, pathology, and implications for helminthicure. *Veterinary Parasitology* **175**: 273–286.
- SHIRAKASHI, S., M. ANDREWS, Y. KISHIMOTO, K. ISHIMARU, T. OKADA, Y. SAWADA, AND K. OGAWA. 2012. Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture* **326–329**: 15–19.
- SILK, M. H., I. M. SPENCE, AND J. H. S. GEAR. 1969. Ultrastructural studies of the blood fluke—*Schistosoma mansoni*. I. The integument. *South African Journal of Medical Science* **34**: 1–10.
- SIRGEL, W. F., P. ARTIGAS, M. D. BARGUES, AND S. MAS-COMA. 2012. Life cycle of *Renyliama capensis*, a brachylaimid trematode of shrews and slugs in South Africa: Two-host and three-host transmission modalities suggested by epizootiology and DNA sequencing. *Parasites & Vectors* **5**: 169.
- SMYTH, J. D., AND D. W. HALTON. 1983. The physiology of trematodes, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 446 p.

- THREADGOLD, L. T. 1984. Parasitic plathyhelminths. In *Biology of the integument*, Volume 1, Invertebrates, J. Bereiter-Hahn, A. G. Matoltsy, and K. S. Richards (eds.). Springer, Berlin, Germany, p. 132–191.
- WANG, J., AND S. ZHOU. 1988. The observation of praziquantel effecting on the tegumental ultrastructure of schistosomulae of *Schistosoma japonicum* in vitro. *Acta Hydrobiologica Sinica* **12**: 286–288.
- XIAO, S. H., J. XUE, L. XU, Y. ZHANG, AND H. QIANG. 2011. Comparative effect of mebendazole, albendazole, tribendimidine, and praziquantel in treatment of rats infected with *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research* **108**: 723–730.
- XIAO, S. H., Y. Q. YANG, B. G. SHEN, D. H. XU, H. Z. YANG, J. Y. MEI, AND W. J. YUE. 1988. Effect of praziquantel on ultrastructure of *Schistosoma japonicum* cercariae and schistosomula within mouse skin. *Acta Pharmacologica Sinica* **9**: 360–363.
- YAMAGUTI, S. 1971. Synopsis of the digenetic trematodes of vertebrates. Volumes 1 and 2, Keigaku Publishing Company, Tokyo, Japan. Vol. 1, 1074 p.; Vol. 2, 349 p.
- YAMAGUTI, S. 1975. A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Publishing Company, Tokyo, Japan, 590 p.
- ZDARSKA, Z. 1994. Surface structures of *Brachylaimus fuscatus* (Digenea: Brachylaimidae) metacercaria. *Folia Parasitologica* **41**: 51–54.
- ZDARSKA, Z., T. N. SOBOLEVA, J. VALKOUNOVA, AND J. STERBA. 1991. Ultrastructure of the general body tegument of the trematode *Brachylaima aequans*. *Helminthologia* **27**: 3–9.
- ZDARSKA, Z., J. STERBA, T. N. SOBOLEVA, AND J. VALKOUNOVA. 1988. Ultrastructure of the digestive tract of *Brachylaimus aequans* (Trematoda: Brachylaimoidea). *Folia Parasitologica* **35**: 105–111.

CAPÍTULO 4: Discusión

Los trematodos digénidos incluidos en la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 constituyen un grupo de notable interés ya que conforman un taxón que integra especies cuyo ciclo biológico es terrestre, un carácter poco frecuente en trematodos y que condiciona tanto su comportamiento biológico como su taxonomía puesto que ésta contempla características biológicas (Pojmanska, 1972, 2002a, b); Mas-Coma y Gállego, 1975). El género *Brachylaima* Dujardin, 1843 aparece incluido en esta familia en la clasificación propuesta por Skrjabin (1948) (Valero, 1986) y continua con su entidad taxonómica en las clasificaciones infrafamiliares clásicas propuestas por Yamaguti (1958, 1971), Zarnowski (1960), Baer y Joyeux (1961), Mas-Coma y Gállego (1975), Brooks y cols. (1985) y Pojmanska (2002a, b) entre otras. Más recientemente, han aparecido propuestas sistemáticas referentes a Digenea basadas en aspectos moleculares como las enunciadas por Cribb y cols. (2001), Olson y cols. (2003) quienes sitúan Brachylaimoidea en un nuevo orden para el que proponen la denominación Diplostomida, conjuntamente con Diplostomoidea y Schistosomatoidea y, últimamente, la propuesta por Heneberg y cols. (2016) para la superfamilia Brachylaimoidea Allison, 1943, centrándose particularmente en seis géneros entre los que se encuentra *Brachylaima*. Cabe destacar la estrecha relación existente entre las especies del género *Brachylaima sensu lato* Dujardin, 1843 y los gasterópodos pulmonados terrestres Stylommatophora, ya que éstos intervienen en sus ciclos biológicos (Yamaguti, 1975; Pojmanska, 1972, 2002a, b; Mas-Coma y cols., 1987a), como primeros hospedadores albergantes del estadio larvario de esporocisto generador de cercarias y como segundos hospedadores albergantes del estadio larvario de metacercaria. De forma similar a la variable especificidad del estadio adulto, llegando a la eurixenia en algunas especies (Mas-Coma y Montoliu, 1986; Mas-Coma y cols., 1987a; Butcher y Grove, 2001; Gracenea y González-Moreno, 2002; González-Moreno y Gracenea, 2006), es también destacable la escasa especificidad que las metacercarias muestran por su hospedador invertebrado (Mas-Coma y cols., 1987a), pudiendo la misma especie parasitar gasterópodos terrestres helícidos y subulínidos (Mas-Coma y Montoliu, 1986) y diferentes géneros de Helicidae (Butcher y Groove, 2001; Gracenea y González-Moreno, 2002; González-Moreno y Gracenea, 2006). Sin embargo, las especies *Brachylaima* muestran una marcada especificidad hacia el gasterópodo primer hospedador intermediario (Mas-Coma y Montoliu, 1986; Gracenea y González-Moreno, 2002; González-Moreno y Gracenea, 2006; Segade y cols., 2011; Nakao y cols., 2017), si bien Butcher y Groove (2001) difieren de esta opinión ya que muestran experimentalmente la intervención de distintas especies de helícidos actuando como emisores de cercarias de *B. cribbi*. En este contexto, la escasa especificidad de las metacercarias *Brachylaima* favorece enormemente la dispersión geográfica de las especies del género ya que éstas pueden resultar vehiculadas por un número muy elevado de especies diferentes de gasterópodos terrestres. Así, el binomio metacercaria *Brachylaima-*

gasterópodo hospedador constituye un campo de estudio interesante. En primer lugar, tiene un marcado interés sanitario, ya que la implicación de caracoles de consumo como hospedadores de metacercarias *Brachylaima* hace posible la parasitación humana si los caracoles se ingieren crudos o insuficientemente cocinados, pudiendo ocasionar la parasitosis denominada braquilaimosis, habiéndose detectado casos de parasitación humana por *B. cribbi* en Australia (Butcher y cols., 1996; Butcher, 2006). Precisamente, los hábitos culinarios y los sistemas de distribución local e internacional son los máximos artífices de la exposición humana a parásitos transmitidos por alimentos y de su emergencia en distintos países (Dorny y cols. 2009). A su vez, la globalización se ha erigido como pieza clave en cuanto a la dispersión de enfermedades infecciosas, incluyendo la emergencia de enfermedades transmitidas por alimentos y la complejidad que éstas entrañan (Robertson y cols., 2014). En segundo lugar, la peculiar dispersión geográfica de algunas especies de caracoles de interés gastronómico y hospedadores de metacercarias *Brachylaima*, como el helícido *C. aspersum*, presente en todos los continentes debido principalmente a la intervención humana (Ansart y cols., 2009), incrementa el interés de su estudio, ya que facilita la dispersión del braquiláimido y su presencia en amplias zonas geográficas. En tercer lugar, cabe destacar que justamente *C. aspersum* actúa como primer y como segundo hospedador intermediario en el ciclo de algunas especies de *Brachylaima*, facilitando su parasitación dado que una única especie de invertebrado puede permitir el desarrollo de todos los estadios larvarios intramoluscales (Gonzalez-Moreno y Gracenea, 2006). Y, por último, resulta realmente interesante constatar el gran potencial que *C. aspersum* presenta en su adaptación a hábitats diferentes y a climas distintos, tratándose de una especie que ha ampliado su área de distribución desde la cuenca mediterránea donde es nativa, a países de clima oceánico e incluso subtropical (Ansart y cols., 2009), hecho que permite anticipar una buena adaptación al cambio climático general que los informes recientes (IPCC, 2013) proponen.

Así, el bionomio metacercarias *Brachylaima*-gasterópodo terrestre y más concretamente metacercarias *Brachylaima*-*C. aspersum* ha sido el objeto de la presente tesis doctoral, avalado por su doble interés sanitario y biológico. Esta doble vertiente de estudio se ha reflejado en los objetivos propuestos que incluyen, en general, a) realizar un estudio exploratorio de la prevalencia de metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum* destinados a consumo en mercados españoles; b) estudiar la dinámica de parasitación del caracol considerando la localización geográfica de los caracoles y la estacionalidad como factores de riesgo en cuanto a la exposición de los consumidores al parásito y la posibilidad de contraer una braquilaimosis; c) describir la influencia de la importación de caracoles a España para su comercialización en mercados ya que puede contribuir a la dispersión geográfica de *Brachylaima* spp.; d) evaluar la

eficacia del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* sp. estableciendo la dosificación y duración del tratamiento; e) desarrollar un método bioanalítico mediante la técnica HPLC-MS/MS que permita la determinación del praziquantel en la matriz del gasterópodo y f) evaluar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) los cambios de ultraestructura producidos por el praziquantel en metacercarias recuperadas de caracoles tratados.

Actualmente en España se concatenan un conjunto de factores que favorecen la aparición de escenarios óptimos para que una parasitosis transmitida por un alimento, como la braquilaimosis, pueda manifestarse: la falta de trazabilidad en los mercados y de controles sanitarios para caracoles de consumo humano, la inespecificidad de la sintomatología general de la braquilaimosis (diarrea, dolor abdominal, anorexia, pérdida de peso o poca ganancia), el pequeño tamaño de los huevos de *Brachylaima* y los flujos de comercio internacional debidos a la globalización, factores que se han contemplado en el capítulo 1.

En este marco encaja perfectamente que caracoles *C. aspersum* importados para consumo humano en España puedan contribuir de forma significativa a la dispersión geográfica de especies *Brachylaima* albergantes de metacercarias viables, lo cual ha sido explicado en la publicación 2. Hasta el momento, *B. llobregatensis* sólo se había detectado en el nordeste de España y, de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo presentado, puede estar presente, también, parasitando *C. aspersum* en Argelia (Norte de África). Las prevalencias, relativamente altas, de metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum* en los mercados, presentadas a lo largo de la publicación 1, pueden explicarse mediante la existencia de reservorios del parásito, muchos de ellos silvestres y algunos peridomésticos como *Rattus rattus*, *R. norvegicus*, y *Mus musculus* los cuales también pueden contribuir significativamente a la dispersión del parásito en caracoles. No resulta sorprendente que el estudio exploratorio de prevalencia de metacercarias *Brachylaima* spp. en *C. aspersum* en los mercados haya alcanzado un valor global del 41'97%. Los resultados obtenidos mediante la aplicación del modelo de regresión logística a la prevalencia de metacercarias *Brachylaima* spp. parasitando *C. aspersum* utilizando la ciudad y la estacionalidad como predictores permitió detectar, con un 79'0% de corrección de predicción global, un efecto estacional en el otoño en general y un efecto de riesgo significativo en las interacciones Barcelona-Otoño (2.551-38.442) y Tudela-Otoño (4.330-78.584). En cuanto a aspectos relacionados con la construcción del modelo, Bennema y cols. (2011) alcanzaron una corrección de predicción global del 75'0% para la presencia de *Fasciola hepatica* en ganado bovino, teniendo en cuenta predictores como la gestión de las granjas y factores climáticos/ambientales. Las condiciones climáticas y la estacionalidad se han asociado, también, al perfil de riesgo de la schistosomiasis (Walz y cols., 2015), a la predicción de

parasitación de *Lymnaea stagnalis* por digénidos (Zbiowska, 1998), y a la infestación de segundos hospedadores intermediarios por parte de caracoles parasitados por trematodos (Madsen y cols., 2015).

Esta asociación entre estacionalidad y la parasitación de *C. aspersum* puede estar reforzada por algunas de las características del gasterópodo, el cual puede disminuir sus periodos de hibernación en escenarios de cambio climático: “cuanto más caluroso mejor” según Gaitán y cols. (2013) quienes comprobaron que las poblaciones de *C. aspersum* se adaptan mejor a ambientes cálidos que otras especies. *C. aspersum* tiene dos periodos de hibernación, uno al final del invierno y otro al final del verano (Dimitriadis, 1992; Porcel y cols., 1996), los cuales podrían acortarse debido a las condiciones de calidez, de forma que tanto la actividad como la movilidad del gasterópodo podrían verse aumentadas (Dahirel y cols., 2014). Y es justamente un aumento de temperatura lo que anticipa el IPCC (“Intergovernmental Panel on Climate Change”), en su quinto informe evaluador publicado a finales de 2007, reafirmando el calentamiento global y considerando muy probable que el número de días y noches fríos disminuyan y que el número de días y noches calurosos aumenten (IPCC, 2013). Consecuentemente, el acortamiento del período de hibernación correspondiente al final del verano, puede permitir una mayor actividad del gasterópodo y el incremento de la parasitación en otoño.

Asimismo, el IPCC (2013) anticipa una mayor frecuencia e intensidad de precipitaciones en Europa y Estados Unidos. Estas condiciones pueden favorecer la parasitación de *C. aspersum* ya que ya que la disponibilidad de agua es el factor más importante desencadenante de la emisión cercariana (Mas-Coma y cols., 1987b) y facilitaría la transmisión de *Brachylaima* spp. desde el gasterópodo primer hospedador intermediario emisor de cercarias al gasterópodo segundo hospedador. Adicionalmente, cabe tener en cuenta que la emisión cercariana comporta una disminución rápida y drástica del número de cercarias maduras contenidas en los esporocistos cercariógenos, lo cual puede promover y dinamizar procesos nuevos de cercariogénesis a partir de elementos germinativos y de cercarias inmaduras, favoreciendo nuevas emisiones en presencia de agua, retroalimentándose así un proceso dinámico continuado (Mas-Coma y cols., 1987c; Mas-Coma y cols., 2009).

Cabe destacar el muy probable aumento en las poblaciones de *C. aspersum* en escenarios climáticos previstos por el IPCC (2013), ya que, como indican Gaitán y cols. (2013), estos gasterópodos se adaptan óptimamente a escenarios de elevación de temperatura y han mostrado una extrema facilidad para la colonización de hábitats climáticos muy diversos, estando, actualmente, ampliamente distribuidos en todos los continentes. En estas circunstancias y dado que un aumento en la población vector podría aumentar la distribución

y la presencia de *Brachylaima* spp., cabe esperar una mayor presencia del parásito en su población de hospedadores intermediarios, viéndose favorecida esta presencia por su carácter de estrategia *r* que confiere a *Brachylaima* una alta capacidad de reacción a cambios ambientales, entre ellos el climático (Mas-Coma y cols., 1987a, 2009).

En este sentido, son continuos los hallazgos de *Brachylaima* spp. en nuevas áreas geográficas y en nuevos hospedadores: *Procyon lotor* en Japón (Matoba y cols., 2006), *Sorex vagrans* en Montana (USA) (Kinsella, 2007), *Atlantoxerus getulus* en Marruecos y las Islas Canarias (López-Darias y cols., 2008), *Rattus norvegicus* en Italia (Milazzo y cols., 2010), *Apodemus* sp. en Eslovaquia (Ondriková y cols., 2010), *Cariama cristata* en Argentina (Lunaschi y Drago, 2012), *Zenaida auriculata* en Brasil (Taroda y cols., 2013) y *Apodemus agrarius* en Korea (Sohn y cols., 2014), *C. aspersum* en Turquía (Köse y cols., 2015) y *Ezohelix gainesi* en Japón (Nakao y cols., 2017). Es importante remarcar que las cercarias *Brachylaima* son capaces de infestar caracoles terrestres de múltiples familias de Stylommatophora, por lo tanto, siendo capaces de llegar a nuevos hospedadores finales mediante vectores diferentes a *C. aspersum* y aumentado así la dispersión de *Brachylaima* spp. (Butcher y Grove, 2001; Adema y Loker, 2015).

En la primera parte de la publicación #3, se ha demostrado la eficacia (reducción de la carga parasitaria hasta en un 95%) *in vivo* del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* spp. parasitando *C. aspersum*. La metodología empleada para tratar a los caracoles, mezclando el praziquantel con el pienso de engorde, es sencilla y económicamente viable en caso de transferencia de la metodología a un ensayo clínico veterinario de campo (en granjas). Ha sido la primera vez que un caracol terrestre recibe un tratamiento farmacológico para desparasitación, mostrando buena aceptación por parte de *C. aspersum* y tolerabilidad, algo que en otros caracoles no había sido así, como es el caso de *Biomphalaria glabrata* (tasa de mortalidad 73'4%) (Riley y Chappel, 1990; Mattos y cols., 2007). El sabor amargo del praziquantel, que había representado un problema para el tratamiento frente monogénidos en el jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) e incluso en humanos (Meyer y cols., 2009; Partridge y cols., 2014), utilizado en la proporción de 12 mg PZQ/g de pienso de caracol no comprometió en ningún caso la eficacia que llegó hasta el 98'7% en el ensayo de determinación de dosis (2'4 mg PZQ/caracol) alcanzando valores similares a los obtenidos por otros investigadores para hámsters y *Echinostoma paraensei* (100%) o ratas y *Schistosoma* sp. (84%) (Xiao y cols., 2011; Gonçalves y cols., 2013).

En la segunda parte de la publicación #3 se ha desarrollado un método bioanalítico para la detección de praziquantel en la matriz biológica de *C. aspersum* mediante HPLC-MS/MS. El método cumplió todos los criterios de la guía de validación de métodos bioanalíticos de

la EMA (EMA, 2011): linealidad, ausencia de “carry over”, selectividad, exactitud, precisión, efecto de la matriz, integridad de la dilución y estabilidad, y estableciendo un límite inferior de cuantificación que permitiría detectar una cantidad 80 veces inferior al límite establecido para el residuo legal en alimentos que han recibido tratamiento con praziquantel. En cuanto a la recuperación de praziquantel (hasta 91’8%), ésta resultó ser similar a las descritas por Hanpitakpong y cols. (2004) quienes cuantificaron praziquantel en plasma (>90%) y por Kim y cols. (2001) quienes lo hicieron en tejido muscular de pez (82’7%), a diferencia de autores como Xie y cols. (2012) quienes recuperaron menos del 50% en tejido de cerdo.

En la determinación de especímenes tratados con 11 mgPZQ/g pienso para caracol *ad libitum* durante 3 días, los resultados experimentales (0’363 mg PZQ/caracol y 0’093 mg PZQ/g caracol) representaron el 10% de los cálculos teóricos basados en el consumo de pienso de caracol (3.603 mg PZQ y 0.924 mg PZQ/g caracol). Estos resultados estarían en línea con los indicados por la EMA para ovejas ya que se cuantificó una eliminación del praziquantel del 88% tras 24h de haber sido administrado a estos animales. En ratas la eliminación tras 24h resultó ser del 100% tanto para órganos como tejidos, encontrándose en perros y monos una eliminación similar. Así pues, cabría pensar que en los caracoles analizados se produjo una eliminación del 90% del fármaco. Siendo así, después de un periodo ventana no habría residuo de praziquantel. Y en caso de querer controlar si hubiera un incumplimiento de los límites establecidos, el método podría identificar los lotes que pudieran comprometer la seguridad alimentaria ya que permitiría retener las muestras a -20°C hasta 3 meses asegurando la estabilidad del praziquantel.

En el capítulo 1 (1.7.1) se ha descrito de forma general la ultraestructura de los trematodos a nivel de tegumento. Según Smyth y Halton (1983), existen tres tipos de inclusiones tegumentarias en los trematodos adultos: inclusiones tegumentarias T1 (cuerpos de alta densidad), inclusiones tegumentarias T2 (de apariencia discooidal y contenido electrodenso) y un tercer tipo de inclusión las vesículas membranosas o multilaminadas. En el caso de metacercarias *Brachylaima* sp. sólo se encuentran presentes las inclusiones tegumentarias T2 (Zdarska y cols., 1994; Ferrer y cols., 2001), y lo mismo sucede en adultos de *B. aequans* (Zdarska y cols., 1991). Las inclusiones tegumentarias T2 pueden encontrarse también en adultos de *F. hepatica* (Bennett y Threadgold, 1973), *E. paraensei* (Gonçalves y cols., 2013), *Halipagus ovocaudatus* (Kechemir, 1978) y *Postorchigenes gymnesicus* (Ferrer y cols., 1996) y en metacercarias de *Diplostomum phoxini* (Bibby y Rees, 1971), *Leucochloridiomorpha constantine* (Harris y cols., 1974), *Zygocotyle lunata* (Irwin y cols., 1991) y *Timonella imbutiforme* (El-Darsh y Whitfield, 2000) aunque en éstas dos últimas

con una denominación distinta. Tal y como se ha explicado en el capítulo 1 (1.5.1) el mecanismo del praziquantel es desconocido, motivo por el cual resulta de interés la descripción de cualquier alteración a nivel de ultraestructura producida por éste.

En este sentido son interesantes las alteraciones de las inclusiones tegumentarias T2 que se han descrito para *E. paraensei* (Gonçalves y cols., 2013) y *S. mansoni* (El-Shabasy y cols., 2015), así como la vacuolización y la degeneración mitocondrial descritas por distintos autores en trematodos (Qian y cols., 1988; Wang y Zhou, 1988; Xiao y cols., 1988; Awad y Probert, 1991; Gonçalves y cols., 2013) y la contracción del digestivo (Awad y Probert, 1991; El-Shabasy y cols., 2015). Teniendo en cuenta que las alteraciones encontradas en la publicación 4 coinciden con las de otras especies, todo apunta a favor de que el praziquantel tenga el mismo mecanismo de acción en *Brachylaima* sp. que en los otros trematodos.

Keiser (2010) remarcó en su trabajo la necesidad de investigar y desarrollar nuevos medicamentos para el tratamiento de las trematodosis transmitidas por alimentos y Cioli y cols. (2014) pusieron en evidencia que el desconocimiento del mecanismo de acción impide el diseño racional de análogos mejorados. Las principales causas de esta situación son la falta de inversión económica para la investigación de nuevos medicamentos trematocidas y el difícil mantenimiento de los ciclos biológicos de trematodos en el laboratorio, ya que suelen ser heteroxenos y complejos (Keiser, 2010).

En este escenario, *C. aspersum* y las metacercarias *Brachylaima* spp. podrían tener un papel importante como modelo de laboratorio para elucidar el mecanismo de acción del praziquantel. En primer lugar, se encuentran fácilmente parasitando los caracoles (tal y como se ha recogido en las publicaciones 1 y 2), en segundo lugar, al tratarse de invertebrados están exentos de la regulación de experimentación animal (Directive 86/609/EC, Directive 2010/63/EU) y, por último, el praziquantel puede administrarse de forma sencilla tal y como se ha visto en las publicaciones 3 y 4. Esto podría permitir estudios acelerados, ya que no es necesario mantener ningún ciclo biológico y se trabajaría directamente con las metacercarias. Así pues, quedaría abierta una puerta para desarrollar nuevos enfoques para el estudio del mecanismo del praziquantel en los que podrían incorporarse las nuevas técnicas de localización de praziquantel en el parásito basadas en la espectrometría de masas y en la proteómica presentadas por Ferreira y cols. (2015), así como intentar llevar a cabo abordajes moleculares que puedan superponerse a los de *Schistosoma* sp., un género que dispone de especies resistentes al praziquantel, y *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* dos especies que no responden al tratamiento con éste (Greenberg, 2006; Sripa y cols., 2010; Mafud y cols., 2016). Todas estas tentativas estarían en consonancia con los razonamientos de Keiser (2010) y Cioli y cols. (2014) respecto a la necesidad del diseño racional de

medicamentos trematocidas donde el binomio *C. aspersum-Brachylaima* spp. podría tener la clave para desvelar este misterio de más de 30 años: el mecanismo de acción del praziquantel.

CAPÍTULO 5: Conclusiones

- La prevalencia global de metacercarias *Brachylaima* spp. parasitando *Cornu aspersum* en los mercados de abasto españoles estudiados fue del 41'97% (95% CI: 40'38%-45'56%), siendo el otoño la estación con más alta prevalencia global (58'65%) y encontrándose en la ciudad de Tudela y en otoño el valor más alto (93'57%).
- Se detecta, en la prevalencia de metacercarias *Brachylaima* spp., un efecto estacional en el otoño y un efecto de riesgo significativo en las interacciones Barcelona-Otoño (2.551-38.442) y Tudela-Otoño (4.330-78.584), mediante el modelo de regresión logística binaria en el que se introduce la localización geográfica y la estacionalidad como predictores de riesgo. El modelo construido alcanza una predicción global correcta del 79'0% siendo del 85'5% para los *Cornu aspersum* no parasitados por metacercarias *Brachylaima* spp. y del 68'8% para los *Cornu aspersum* parasitados.
- La aproximación de adultos experimentales obtenidos a partir de metacercarias de ejemplares *Cornu aspersum* de Argelia y Sudáfrica a adultos *Brachylaima llobregatensis* y *Brachylaima mascomai* confirma que los flujos de comercio internacionales pueden contribuir a la dispersión de *Brachylaima* spp.
- La eficacia, medida como reducción de la carga parasitaria, del tratamiento de *Cornu aspersum* parasitados por metacercarias *Brachylaima* spp. con praziquantel administrado mediante mezcla con el pienso de engorde a dosis 1'8 mgPZQ/caracol es del 97'3% ($p < 0.001$) y a dosis 2'4 mgPZQ/caracol del 98'7% ($p < 0.001$).
- La dosis, pauta y duración del tratamiento de *Cornu aspersum* parasitados por metacercarias *Brachylaima* spp. en condiciones similares a granja, corresponde a la administración de una mezcla de pienso de engorde (12mgPZQ/g pienso, 2'4 mgPZQ/caracol) *ad libitum* durante 7 días, siendo la eficacia de 94'6% ($p = 0.001$).
- El método bioanalítico desarrollado y validado mediante HPLC-MS/MS cumple con los requisitos de la “Guía de validación de métodos bioanalíticos EMEA/CHMP/EWP/192217/2009” de la Agencia Europea del Medicamento y permite la determinación del residuo de praziquantel en la matriz biológica de *Cornu aspersum*.
- El protocolo propuesto para el análisis del residuo de praziquantel en la matriz biológica de *Cornu aspersum* permite la identificación y cuantificación de praziquantel en los límites fijados por la legislación (10 mgPZQ/día, 400µg/caracol), siendo el límite inferior

de cuantificación 0'05 µg/ml correspondiente a 5 µg/caracol (una cantidad 80 veces más pequeña que la requerida).

- La detección de praziquantel fue positiva en todas las muestras procedentes de *Cornu aspersum* tratados y la detección fue negativa para todas las muestras de *Cornu aspersum* no tratados.
- El praziquantel produce profundas alteraciones ultraestructurales en las inclusiones tegumentarias T2 (contenido, forma y orientación) y degeneración mitocondrial en el tegumento de las metacercarias *Brachylaima* spp. recuperadas de *Cornu aspersum* tratados y contracción del digestivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adema, C.M., Loker, E.S., 2015. Digenean–gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Dev. Comp. Immunol.* 48, 275–283.
- Africa, C.M., García, E.Y., De Leon, W., 1935. Intestinal heterophyidiasis with cardiac involvement: A contribution to the etiology of heart failure. *Philipp. J. Public Health* 1, 1–35.
- Alexander, N., 2012. Review: analysis of parasite and other skewed counts. *Trop. Med. Int. Health* 17, 684–693.
- Ansart, A., Guiller, A., Madec, L., 2009. CABI Invasive Species Compendium: *Cornu aspersum*. In: CABI editor. London. 19p.
- Ansart, A., Vernon, P., Daguzan, J., 2002. Elements of cold hardiness in a littoral population of the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata). *J. Comp. Physiol. B* 172, 619–625.
- Afshan, K., Valero, M., Qayyum, M., Peixoto, R., Magraner, A., Mas-Coma, S., 2014. Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *J. Helminthol.* 88, 417–426.
- Ahasan, S.A., Valero, M.A., Chowdhury, E.H., Islam, M.T., Islam, M.R., Hussain, M., Mohammad, M., Mas-Coma, S., 2016. CIAS detection of *Fasciola hepatica*/*F. gigantica* intermediate forms in bovines from Bangladesh. *Acta Parasitol.* 61, 267–277.
- Ardrey, R.E., 2003. Liquid chromatography–mass spectrometry: an introduction. *Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)*. Editor: Davie J. Ando. John Wiley & Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ England, 276p.
- Ashrafi, K., Valero, M.A., Panova, M., Periago, M.V., Massoud, J., Mas-Coma, S., 2006. Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitol. Int.* 55, 249–260.
- Ashrafi, K., Valero, M.A., Peixoto, R.V., Artigas, P., Panova, M., Mas-Coma, S., 2015. Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan, Iran: Relationships between zonal overlap and phenotypic traits. *Infect. Genet. Evol.* 31, 95–109.
- Awad, A. H., Probert, A.J., 1991. The effect of praziquantel on the ultrastructure of *Schistosoma margrebowiei*. *J. Helminthol.* 65, 79–88.
- Baer, J.G., Joyeux, C., 1961. Classe des Trématodes (Trematoda Rudolphi). In: *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*. Vol. IV. Grassé, Masson et Cie Editorial, Paris, France, 561–692pp.
- Bech, M., 1990. Fauna malacològica de Catalunya. Mol·luscs terrestres i d'aigua dolça. *Treballs de la Institució Catalana d'Història Natural, Barcelona*, 229p.
- Belizario, V.Y. Jr, Bersabe, M.J., de Leon, W.U., Hilomen, V.Y., Paller, G.V., de Guzman, A.D. Jr, Bugayon, M.G., 2001. Intestinal heterophyidiasis: an emerging food–borne parasitic zoonosis in southern Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32(Supl.), 36–42.
- Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruysse, J., Claerebout, E., Hendrickx, G., Charlier, J., 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *Int. J. Parasitol.* 41, 225–233.
- Bennet, C.E., Threadgold, L.T., 1973. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XIII. Fine structure of the newly excysted juvenile. *Exp. Parasitol.* 34, 85–99.

Bibliografia

- Bibby, M.C., Rees, G., 1971. The ultrastructure of the epidermis and associated structures in the metacercaria cercaria and sporocyst of *Diplostomum phoxini* (Faust, 1918). *Parasitol. Res.* 37, 169–186.
- Brooks, D.R., O’Grady, R.T., Glen, D.R., 1985. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. *Can. J. Zool.* 63, 411–443.
- Butcher, A.R., 2006. Review of Thirteen Cases of *Brachylaima cribbi* Intestinal Fluke Worm Infection in Children and Adults from South Australia. 2006 Annual Scientific Meeting Exhibition Australian Society of Microbiology. (ASM 2006).
- Butcher, A.R. 2016. Under the microscope. Children, snails and worms: the *Brachylaima cribbi* story. *Microbiology Australia* March, 30–33.
- Butcher, A.R., Grove, D.I., 2001. Description of the life–cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Syst. Parasitol.* 49, 211–221.
- Butcher, A.R., Brealey, J.K., Grove, D.I., Dymock, R.B., 2002. *Brachylaima cribbi* (Digenea: Brachylaimidae): Scanning electron microscopical observations of the life–cycle stages. *J. Helminthol.* 76, 207–215.
- Butcher, A.R., Parasuramar, P., Thompson, C.S., Grove, D.I., 1998. First report of the isolation of an adult worm of the genus *Brachylaima* (Digenea: Brachylaimidae), from the gastrointestinal tract of a human. *Int. J. Parasitol.* 28, 607–610.
- Butcher, A.R., Talbot, G.A., Norton, R.E., Kirk, M.D., Cribb, T.H., Forsyth, J.R., Knight, B., Cameron, A.S., 1996. Locally acquired *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) intestinal fluke infection in two South Australian infants. *Med. J. Aust.* 164, 475–478.
- Byong–Seol S., In–June, C., Jong–Yil, C., 1985. Studies on intestinal trematodes in Korea. XIX. Light and scanning electron microscopy of *Fibricola seoulensis* collected from albino rats treated with praziquantel. *Korean J Parasitol.* 23, 47–57.
- Cadevall J., Orozco A., 2016. Nuevas guías de campo Omega. Caracoles y babosas de la Península Ibérica y Baleares. Editorial Omega, pp.554–555.
- Chevallier, H., 1977. La variabilité de l’escargot petit–gris *Helix aspersa* Müller. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris, série III*, 448, 425–442.
- Chevallier, H., 1986. L’élèveage des escargots: production et préparation du petit–gris. Editions du Point Vétérinaire. Maisons–Alfort, France.
- Cioli, D., Pica–Mattocchia, L., Basso, A., Guidi, A., 2014. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 23–29.
- Cribb, T.H., 1990. Introduction of a *Brachylaima* species (Digenea: Brachylaimidae) to Australia. *Int. J. Parasitol.* 20, 789–796.
- Cribb, T.H., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., Pichelin, S.P., Herniou, E.A., 2001. The Digenea. *In.*: Interrelationships of the Platyhelminthes. Editors: D.T.J. Littlewood, R.A Bray. Taylor and Francis, London, 168–185pp.
- Daguzan, J., 1980. Les principales caractéristiques du petit–gris. *In.*: L’élèveage des escargots petits–gris. Editorial I.T.A.V.I., Paris, pp.15–18.
- Dahirel, M., Ansart, A., Madec, L., 2014. Stage– and weather–dependent dispersal in the brown garden snail *Cornu aspersum*. *Popul. Ecol.* 56, 227–237.

- Daniel, W.W., 2002. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa Wiley, México, pp.176–177.
- Dass, C. 2007. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Wiley–Interscience Series on Mass Spectrometry. Dominic M. Desiderio and Nico M. Nibbering, Series Editors. John Wiley & Sons, Ltd. Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 585p.
- Diari Oficial de la Generalitat Valenciana, 2012. DECRETO 21/2012, de 27 de enero, del Consell, por el que se regula el procedimiento de elaboración y aprobación de los planes de recuperación y conservación de especies catalogadas de fauna y flora silvestres, y el procedimiento de emisión de autorizaciones de afectación a especies silvestres. [2012/832]. http://www.dogv.gva.es/portal/ficha_disposicion_pc.jsp?sig=001025/2012&L=1 Accessed 9th March 2017.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002. REGLAMENTO (CE) No 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:ES:PDF> Accessed 9th March 2017.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2004a. REGLAMENTO (CE) No 1774/2004 DE LA COMISIÓN de 14 de octubre de 2004 que modifica el Reglamento (CE) no 1623/2000 por el que se fijan las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 1493/1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, en lo que respecta a los mecanismos de mercado. [http://www.mapama.gob.es/alimentacion/pags/legislacion/pdf/2004/Octubre/REGL\(CE\)1774-2004.pdf](http://www.mapama.gob.es/alimentacion/pags/legislacion/pdf/2004/Octubre/REGL(CE)1774-2004.pdf) Accessed 9th March 2017.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2004b. REGLAMENTO (CE) N°852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:es:PDF> Accessed 9th March 2017.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2004c. REGLAMENTO (CE) N° 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:ES:PDF> Accessed 9th March 2017.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2005. Reglamento (CE) no183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2005, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=URISERV%3Af81002> Accessed 9th March 2017.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2007. REGLAMENTO (CE) no 1234/2007 DEL CONSEJO de 22 de octubre de 2007 por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícola (Reglamento único para las OCM). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2007R1234:20090701:ES:PDF> Accessed 9th March 2017.
- Dimitriadis, V.K., 1992. Effect of starvation and hibernation on the fine structural morphology of digestive gland cells of the snail *Helix lucorum*. Malacologia 34, 63–73.

Bibliografía

- Directive 86/609/EEC, Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eeec_en.pdf
Accessed 9th March 2017.
- Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>,
Accessed 9th March 2017.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* 163, 196–206.
- El-Darsh, H.E.M., Whitfield, P.J., 2000. Ultrastructure of the tegument of the metacercaria of *Timonella imbutiforme*. *J. Helminthol.* 74, 57–66.
- El-Shabasy, E.A., Reda, E.S., Abdeen, S.H., Said, A. E., Ouhtit, A., 2015. Transmission electron microscopic observations on ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation attenuated vaccine and/or praziquantel in addition to passive immunization with normal and vaccinated rabbit sera against infection. *Parasitol. Res.* 114, 1563–1580.
- EMA, 1996. Committee for Veterinary Medicinal Products "Praziquantel". Summary Report (1). EMEA/MRL/141/96–FINAL.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015784.pdf
Accessed 5th November 2017.
- EMA, 1998. Committee for veterinary medicinal products "Praziquantel (extension to sheep milk)". Summary report (2) EMEA/MRL/523/98–FINAL.
- EMA, 2011. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
Accessed 5th November 2017.
- Fairweather, I., Threadgold, L.T., Hanna, R.E.B., 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. *In: Fasciolosis*. Editor J.P. Dalton, CAB International, Wallingford, p.47–111.
- Fei, C., Chao, F., Qiping, Z., Yang, L., Xiaoyang, W., Wenli, Z., Mi, W., Keyu, Z., Lifang, Z., Tao, Li., Feiqun, X., 2013. Anticoccidial effects of a novel triazine nitromezuril in broiler chickens. *Vet. Parasitol.* 198, 39–44.
- Fernández-López de Pablo, J., Badal, E., Ferrer García, C., Martínez-Ortí, A., Sanchis Serra, A., 2014. Land snails as a diet diversification proxy during the early upper palaeolithic in Europe. *PLoS One* 9, e104898.
- Ferreira, M.S., de Oliveria, R.N., de Oliveira, D.N., Esteves, C.Z., Allegretti, S.M., Catharino, R.R., 2015. Revealing praziquantel molecular targets using mass spectrometry imaging: an expeditious approach applied to *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 45, 385–391.
- Ferraz, J., Souza, J., Costa-Silva, M., Torres, E., Santana, A., Lanfredi, R., Maldonado, A., Garcia, J., 2012. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitol. Res.* 111, 143–148.
- Ferrer, J.R., González-Moreno, O., Gracenea, M., 2001. Actin cytoskeleton in adults and metacercariae of *Brachylaima* sp. *J. Helminthol.* 75, 337–344.

- Ferrer, J.R., Gracenea, M., Trullols, M., Gonzalez-Moreno, O., 1996. Ultrastructural observations of the tegument of *Postorchigenes gymnesicus* (Digenea: Lecithodendriidae). *J. Helminthol.* 70, 13–19.
- Fitzpatrick, J.L., 2013. Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. *Vet. Parasitol.* 195, 233–248.
- Fried, B., 1997. Advances in trematode biology. *In* An overview of the biology trematodes. B. Editors: Fried, and T.K. Graczyk. CRC Press LLC, New York, U.S. p.1–30.
- Gaitán-Espitia, J.D., Belén Arias, M., Lardies, M.A., Nespolo, R.F., 2013. Variation in thermal sensitivity and thermal tolerances in an invasive species across a climatic gradient: lessons from the land snail *Cornu aspersum*. *PLoS One* 8, e70662.
- González-Moreno, O., 2002. Contribución al conocimiento de la bionomía de digénidos de la Familia Brachylaimidae de Joyeux et Foley, 1930, en el delta del Llobregat (Barcelona). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 375p.
- González-Moreno, O., Gracenea, M., 2006. Life cycle and description of a new species of brachylaimid (Trematoda: Digenea) in Spain. *J. Parasitol.* 92, 1305–1312.
- González-Moreno, O., Gracenea, M., Montoliu, I., Villa, M., 1994. Presencia de digénidos Brachylaimidae en el Delta del Llobregat (Barcelona): Estados larvarios parásitos de gasterópodos terrestres. *Iberus* 12, 49–57.
- Gonçalves, J.P., Oliveira-Menezes, A., Maldonado Junior, A., Carvalho, T.M.U., de Souza, W., 2013. Evaluation of Praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Vet. Parasitol.* 194, 16–25.
- Gracenea, M., González-Moreno, O., 2002. Life cycle of *Brachylaima mascomai* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rats in the Llobregat Delta (Spain). *J. Parasitol.* 88, 124–133.
- Gracenea, M., González-Moreno, O., García Ruíz, R., Freixas, S., López de Arriba, M., 2009. *Brachylaima* metacercariae parasitizing terrestrial edible snails in public markets. *Acta Parasitol. Port.* 16, 168–169.
- Greenberg, R. M., 2006. Parasitic flatworms : molecular biology, biochemistry, immunology and physiology. *In*: Praziquantel: Mechanism of action. Editors: A.G. Maule, and N. J. Marks. CAB International, Oxfordshire, UK. pp.269–278.
- Guiller, A., Madec, L., 2010. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: a new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *BMC Evol. Biol.* 10, 18.
- Guiller, A., Coutellec-Vreto, M.A., Madec, L., Deunff, J., 2001. Evolutionary history of the land snail *Helix aspersa* in the Western Mediterranean: preliminary results inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Ecol.* 10, 81–87.
- Guiller, A., Martin, M.C., Hiraux, C., Madec, L., 2012. Tracing the invasion of the mediterranean land snail *Cornu aspersum aspersum* becoming an agricultural and garden pest in areas recently introduced. *PLoS One* 7, e49674.
- Hahn, C., Bakke, T.A., Bachmann, L., Weiss, S., Harris, P.D., 2011. Morphometric and molecular characterization of *Gyrodactylus teuchis* Lutraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vignelle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae) from an Austrian brown trout population. *Parasitol. Int.* 60, 480–487.
- Hanelt, B., Janovy Jr, J., 2002. Morphometric analysis of nonadult characters of common species of american gordiids (Nematomorpha: Gordioidea). *J. Parasitol.* 88, 557–562.

Bibliografia

- Hanpitakpong, W., Banmairuroi, V., Kamanikom, B., Choemung, A., Na-Bangchang, K., 2004. A high-performance liquid chromatographic method for determination of praziquantel in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 871–876.
- Harder, A., Goossens, J., Andrews, P., 1988. Influence of praziquantel and Ca^{2+} on the bilayer-isotropic-hexagonal transition of model membranes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 55–59.
- Harris, K.R., Cheng, T.C., Cali, A., 1974. An electron microscope study of the tegument of the metacercariae and adult of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda: Brachylaimidae). *Parasitology* 64, 245–252.
- Heneberg, P., Sitko, J., Bizos, J., 2016. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida). *Parasitology* 143, 455–474.
- Hoflack, G., Maes, D., Mateusen, B., Verdonck, M., De Kruif, A., 2001. Efficacy of tilmicosin phosphate (Pulmotil® Premix) in feed for the treatment of clinical outbreak of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in growing-finishing pigs. *J. Vet. Med.* 48, 655–664.
- Hopkins, D.C., Baker, G.H., 1993. Biological control of white and conical snails. *In: Pest control and sustainable agriculture*. Editors: S.A. Corey, D.J. Dall & W.M. Milne. CSIRO Publications, Melbourne, pp. 246–249
- IPCC, 2013. Summary for Policymakers. *In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Editors: Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1–28.
- Irwin, S.W.B., McCloughlin, T.J.J., Fried, B., 1991. Scanning and transmission electron microscopical observations on the tegument of excysted metacercariae and adults of *Zygocotyle lunata*. *J. Helminthol.* 65, 613–620.
- Istituto Internazionale di Elicicoltura Cherasco, 2015. <http://www.lumache-elici.com/>
Accessed 30th March 2017.
- Jiang, H., Zeng, J., Kandoussi, H., Liu, Y., Wang, X., Bifano, M., Cojocar, L., Ryan, J., Arnold, M.E., 2012. A sensitive and accurate liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative determination of the novel hepatitis C NS5A inhibitor BMS-790052 (daclatasvir) in human plasma and urine. *J. Chromatogr. A* 1245, 117–121.
- Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Sobhon, P., Riengrojpitak, S., Kangwanransan, N., 2005. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol. Int.* 54, 177–183.
- Johansen, M. V., Monrad, J., Ø. Christensen, N., 1996. Effects of praziquantel on experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 62, 83–91.
- Kean, B.H., Breslau, R.C., 1964. Parasites of the human heart, *In: Cardiac Heterophyidiasis*. Grune and Stratton, New York, pp. 95–103.
- Keiser, J., 2010. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology* 137, 589–603.
- Keiser, J., Utzinger, J., 2009. Food-borne trematodiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 466–483.
- Kechemir, N., 1978. Evolution ultrastructurale du tegument d'*Halipegus ovocaudatus* Vulpian, 1858 au cours de son cycle biologique. *Parasitol. Res.* 57, 17–33.

- Kim, K.H., Kim, C.S., Kim, J. W., 2001. Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* after oral and bath treatment. *Dis. Aquat. Organ.* 45, 203–207.
- Kim, C.S., Cho, J.B., Ahn, K.J., Lee, J.I., Kim, K.H., 2003. Depletion of praziquantel in muscle tissue and skin of cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) under the commercial culture conditions. *Aquaculture* 219, 1–7.
- Kinsella, J., 2007. Helminths of the vagrant shrew, *Sorex vagrans*, from western Montana, USA. *Acta Parasitol.* 52, 151–155.
- Klingenberg, C.P., 1996. Multivariate allometry. In: *Advances in Morphometrics. Proceedings of the 1993 NATO ASI on Morphometrics.* Editors: L.F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G.J.P. Naylor, D. Slice. New York: Plenum Publ NATO ASI, Life Sciences, 23.
- Kohn, A.B., Anderson, P.A.V., Roberts–Misterly, J.M., Greenberg, R.M., 2001a. Schistosome calcium channel β subunits: unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *J Biol. Chem.* 276, 36873–36876.
- Kohn, A.B., Lea, J.M., Roberts–Misterly, J.M., Anderson, P.A.V., Greenberg, R.M., 2001b. Structure of three high voltage–activated Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunits from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 123, 489–497.
- Kohn, A.B., Roberts–Misterly, J.M., Anderson, P.A.V., Khan, N., Greenberg, R.M., 2003. Specific residues in the beta interaction domain of a schistosome Ca^{2+} channel β subunit are key to its role in sensitivity to the antischistosomal drug praziquantel. *Parasitology* 127, 349–356
- Köse, M., Eser, M., Kartal, K., Bozkurt, M.F., 2015. Infections of larval stages of *Dicrocoelium dendriticum* and *Brachylaima* sp. in brown garden snail, *Helix aspersa*, in Turkey. *Korean J. Parasitol.* 53, 647–651.
- Kyriakis, S.C., Tsiloyiannis, J., Vlemmas, J., Lekkas, S., Petridou, E., Sarris, K., 1997. The efficacy of enrofloxacin in–feed medication by applying different programmes for the control of post weaning oedema disease in weaned piglets. *J. Vet. Med.* 44, 523–528.
- Lee, S. 1985. *In–vitro* effects of praziquantel on *Fibricola seoulensis*. *Seoul J. Med.* 26, 41–51.
- Lee, S., Park, H., Hong, S., Chai, J., Hong, S., 1987. *In vitro* effect of praziquantel on *Paragonimus westermani* by light and scanning electron microscopic observation. *Korean J. Parasitol.* 25, 24–36.
- Lia, R., Traversa, D., Laricchiuta, P., Dantas–Torres, F., Paradies, R., Alvinerie, M., Krecek, R.C., Otranto, D., 2010. Efficacy of an in–feed formulation containing ivermectin for the control of intestinal strongyles in captive zebras (*Equus burchelli* (Gray, 1824)). *Vet. Parasitol.* 169, 133–137.
- Lima S.F., Vieira, L.Q., Harder, A., Kusel, J.R., 1994. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 109, 57–64.
- López–Darias, M., Ribas, A., Feliú, C., 2008. Helminth parasites in native and invasive mammal populations: comparative study on the Barbary ground squirrel *Atlantoxerus getulus* L. (Rodentia, Sciuridae) in Morocco and the Canary Islands. *Acta Parasitol.* 53, 296–301.
- Lubell, D.L., 2004. Prehistoric edible land snails in the circum–Mediterranean: the archaeological evidence. *Petits animaux et sociétés humaines. du complément alimentaire aux ressources utilitaires XXIV^e Rencontres Internationales d’Archéologie et d’Histoire d’Antibes* 77–98.
- Lunaschi, L.I., Drago, F.B., 2012. Digenean parasites of *Cariama cristata* (Aves, Gruiformes) from Formosa Province, Argentina, with the description of a new species of the genus *Strigea*. *Acta Parasitol.* 57, 26–33.

Bibliografía

- Madsen, H., Bui, T.D., Dang, T.T., Nguyen, K.V., Dalsgaard, A., Phan, T.V. 2015. The role of rice fields, fish ponds and water canals for transmission of fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture ponds in Nam Dinh province, Vietnam. *Parasites & Vectors* 8, 625.
- Mafud, A.C., Ferreira, L.G., Mascarenhas, Y.P., Andricopulo, A.D, de Moraes, J., 2016. Discovery of Novel Antischistosomal Agents by Molecular Modeling Approaches. *Trends Parasitol.* 32, 87, 874–886.
- Mas-Coma, S., Gallego, J., 1975. Algunas consideraciones sistemáticas sobre las familias Brachylaemidae Joyeux y Foley, 1930 y Leucochloridiomorphidae Travassos y Kohn, 1966 (Trematoda: Brachylaemoidea). *Rev. Iber. Parasitol.* 35, 339–354.
- Mas-Coma, S., Montoliu, I., 1986. The life cycle of *Brachylaima ruminiae* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rodents. *Parasitol. Res.* 72, 739–753.
- Mas-Coma, S., Montoliu, I., Valero, M.A., 1984. Méthodologie d'étude morphométrique de la variabilité intraspécifique chez les Digènes de la famille Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930. *Bull. Soc. Neuchl. Sci. Nat.* 107, 185–195.
- Mas-Coma, S., Valero, A., Bargues, M.D., 2009. Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Adv. Parasitol.* 69, 41–146.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Gracenea, M., Montoliu, I., 1987a. Las estrategias etoecológicas generales y específicas en el ciclo biológico de los digénidos Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea) y el concepto de selección r/K. *In: Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario, Mamíferos y Helmintos.* Editores: V. Sans-Coma, S. Mas-Coma, and J. Gosálbez. Ketres Editora S.A., Barcelona, Spain, pp.217–251.
- Mas-Coma, S., Gracenea, M., Montoliu, I., Bargues, M.D., 1987b. Características cronobiológicas de la emisión de cercarias de especies de Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea). *In: Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario, Mamíferos y Helmintos.* Editores: V. Sans-Coma, S. Mas-Coma, and J. Gosálbez. Ketres Editora S.A., Barcelona, Spain, pp.319–329.
- Mas-Coma, S., Bargués, M.D., Gracenea, M., 1987c. La dinámica de la producción cercariana en digénidos Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea): hipótesis de funcionamiento. *In: Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario, Mamíferos y Helmintos.* Editores: V. Sans-Coma, S. Mas-Coma, and J. Gosálbez. Ketres Editora S.A., Barcelona, Spain, pp. 331–338.
- Matoba, Y., Yamada, D., Asano, M., Oku, Y., Kitaura, K., Yagi, K., Tenora, F., Asakawa M., 2006. Parasitic helminths from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *Helminthol.* 43, 139–146.
- Mattison, R.G., Hanna, R.E.B., Nizami, W.A., 1994. Ultrastructure and histochemistry of the tegument of juvenile paramphistomes during migration in Indian ruminants. *J. Helminthol.* 68, 211–221.
- Mattos, A.C.A., Pereira, G.C., Jannotti-Passos, L., Kusel, J.R., Coelho, P.M.Z., 2007. Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 102, 84–91.
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R., Kijlstra, A., 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 221–270.
- Meyer, T., Sekljic, H., Fuchs, S., Bothe, H., Schollmeyer, D., Miculka, C., 2009. Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3.

- Michels, M.G., Bertolini, L.C.T., Esteves, A.F., Moreira, P., Franca, S.C., 2011. Anticoccidial effects of coumestans from *Eclipta alba* for sustainable control of *Eimeria tenella* parasitosis in poultry production. *Vet. Parasitol.* 177, 55–60.
- Milazzo, C., Ribas, A., Casanova, J., Cagnin, M., Geraci, F., Bella, C., 2010. Helminths of the brown rat (*Rattus norvegicus*) (Berkenhout, 1769) in the city of Palermo, Italy. *Helminthol.* 47, 238–240.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Gobierno de España), 2013. Orden AAA/334/2013, de 27 de febrero, por la que se definen las explotaciones asegurables, las condiciones técnicas mínimas de explotación y manejo, el ámbito de aplicación, los periodos de garantía, las fechas de suscripción, y el valor de la producción de los moluscos en relación con el seguro de acuicultura marina para mejillón de la Comunidad Autónoma de Galicia, comprendido en el Plan 2013 de Seguros Agrarios Combinados. <https://www.boe.es/boe/dias/2013/03/01/pdfs/BOE-A-2013-2299.pdf>
Accessed 7th June 2017.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Gobierno de España), 2016. Información del sector helicícola. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/helicicola>
Accessed 7th June 2017.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009. Guías de prácticas correctas de higiene helicultura. 85 p. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones. http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/guia_tcm7-6049.pdf
Accessed 7th June 2017.
- Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales (Gobierno de España), 2003. Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-8510>
Accessed 7th June 2017.
- Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales (Gobierno de España), 2004. Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2004-6426>
Accessed 7th June 2017.
- Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales (Gobierno de España), 2006. Real Decreto 1144/2006, de 6 de octubre, por el que se regulan las condiciones de aplicación de la normativa comunitaria en materia de higiene de los piensos. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2006-18145
Accessed 7th June 2017.
- Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales (Gobierno de España), 2007. Reglamento (CE) n° 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2007-82055>
Accessed 7th June 2017.
- Moghaddam, A.S, Massoud, J., Mahmoodi, M., Mahvi, A.H., Periago M.V., Artigas, P., Fuentes, M.V., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2004. Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitol. Res.* 94, 61–69.
- Naciones Unidas, 2016. COMTRADE database DESA/UNSD. <http://comtrade.un.org>
Accessed 18th April 2017.

Bibliografía

- Nakao, M., Waki, T., Sasaki, M., Anders, J.L., Koga, D., Asakawa, M., 2017. *Brachylaima ezohelicis* sp. nov. (Trematoda: Brachylaimidae) found from the land snail *Ezohelix gainesi*, with a note of an unidentified *Brachylaima* species in Hokkaido, Japan. *Parasitol. Int.* 66, 240–249.
- Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int. J. Parasitol.* 33, 733–755.
- Ondříková, J., D. Miklisová, A. Ribas, M. Stanko. 2010. The helminth parasites of two sympatric species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae) from south-eastern Slovakia. *Acta Parasitologica* 55, 369–378.
- Orlandi, P.A., Chu, D.T., Bier, J.W., Jackson, G.J., 2002. Parasites and the food supply. *Food Technol.* 56, 72–81.
- Partridge, G.J., Michael, R.J., Thuillier, L., 2014. Praziquantel form, dietary application method and dietary inclusion level affect palatability and efficacy against monogenean parasites in yellowtail kingfish. *Dis. Aquat. Organ.* 109, 155–163.
- Perea, J., Garcia, A., Gómez, G., Acero, R., Peña, F., Gómez, S., 2007. Effect of light and substratum structural complexity on microhabitat selection by the snail *Helix aspersa* Müller. *J. Molluscan Stud.* 73, 39–43.
- Periago, M., Valero, V., Panova, A., Mas-Coma, S., 2006. Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitol. Res.* 99, 368–378.
- Periago, M.V., Valero, M.A., El Sayed, M., Ashrafi, K., El Wakeel, A., Mohamed, M.Y., Desquesnes, M., Curtale, F., Mas-Coma, S., 2008. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Inf. Gen. Evol.* 8, 51–58.
- Pojmańska, T., 1972. An attempt to estimate the value of some morphological and biological characters for establishing the taxa of various ranks within the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda). *Acta Parasitol. Pol.* 20, 249–257.
- Pojmańska, T., 2002a. Family Brachylaimidae Joyeux and Foley, 1930. *In: Keys to the Trematoda*. Editors: D.I. Gibson, A. Jones, R.A. Bray. CAB International and Natural History Museum, London, pp.37–45.
- Pojmańska, T., 2002b. Superfamily Brachylaimoidea Joyeux and Foley, 1930. *In: Keys to the Trematoda*. Editors: D.I. Gibson, A. Jones, R.A. Bray. CAB International and Natural History Museum, London, pp.31–36.
- Porcel, D., Bueno, J.D., Almendros, A., 1996. Alterations in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Müller (gastropoda, pulmonata) after prolonged starvation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 115, 11–17.
- Prochile, 2011. Estudio de mercado de caracoles de tierra en Francia.
http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files_mf/documento_01_04_12173158.pdf
Accessed 30th March 2015.
- Qian, M., Liu, Y., Guan, L., Wang, X., 1988. Light and electron microscopic studies on the effects of l-, d- and dl-praziquantel on *Clonorchis sinensis*. *Acta Pharmacol. Sin.* 9, 457–460.
- Reda, E.S., Ouhitit, A., Abdeen, S.H., El-Shabasy, E.A., 2012. Structural changes of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation-attenuated vaccine and/or praziquantel against infection. *Parasitol. Res.* 110, 979–992.
- Ribeiro, F., Coelho, P.M., Vieira, L.Q., Watson, D.G., Kusel, J.R., 1998. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 116, 229–236.

- Riley, E.M., Chappell, L.H., 1990. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 101, 211–217.
- Riditid, W., 2002. LC determination of praziquantel in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 181–186.
- Robertson, L.J., Sprong, H., Ortega, Y.R., Van der Giessen, J.W.B., Fayer, R., 2014. Impacts of globalisation on foodborne parasites. *Trends Parasitol.* 30, 37–52.
- Rohlf, F.J., Marcus, L.F., 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evolut.* 8, 129–132.
- Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G., 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *J. Parasitol.* 86, 228–232.
- RuralCat, 2010. Dossier Tècnic Formació i Assessorament al sector agroalimentari. Helicicultura. La cria de caragols una opció ramadera en l'agricultura catalana. Generalitat de Catalunya Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural 46, 19p.
- Salvador-Recatalà V., Greenberg R.M., 2012. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers. *WIREs Membr. Transp. Signal.* 1, 85–93.
- Segade, P., Crespo, C., García, N., García-Estévez, J.M., Arias, C., Iglesias, R., 2011. *Brachylaima aspersae* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) infecting farmed snails in NW Spain: Morphology, life cycle, pathology, and implications for heliciculture. *Vet. Parasitol.* 175, 273–286.
- Smyth, J. D., Halton, D.W., 1983. The physiology of trematodes, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 446p.
- Sohn, W.M., Na, B.K., Song, H.J., Kim, C.M., Nam, G.J., 2014. Intestinal helminthic infections in striped field mice, *Apodemus agrarius*, from two southern regions of Korea. *Korean J. Parasitol.* 52, 419–423.
- Shirakashi, S., Andrews, M., Kishimoto, Y., Ishimaru, K., Okada, T., Sawada, Y., Ogawa, K., 2012. Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture* 326, 15–19.
- Spratt, D.M., 2005. Australian ecosystems, capricious food chains and parasitic consequences for people. *Int. J. Parasitol.* 35, 17–24.
- Sripa, B., Kaewkes, S., Intapan, P.M., Maleewong, W., Brindley, P.J., 2010. Food-borne trematodiasis in Southeast Asia epidemiology, pathology, clinical manifestation and control. *Adv. Parasitol.* 72, 305–350.
- Tallima, H., El Ridi, R., 2007. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29, 570–575.
- Taroda, A., de Barros, L.D., Zulpo, D.L., da Cunha I.A., Paiva, M.C.D.C., Sammi, A.S., dos Santos, J.R., Yamamura, M.H., Vidotto, O., Garcia, J.L., 2013. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 415–419.
- Taylor J.W., 1914. Monograph of the Land and Freshwater Mollusca of the British Isles, Zonitidae, Endodontidae, Helicidae. Leeds, UK. Taylor Brothers, 312p.
- Valero, A., 1986. Revisión sistemática de la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Digenea: Brachylaimidae) con aportaciones al conocimiento de la variabilidad intraespecífica de los adultos de sus especies representantes. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 908p.

Bibliografía

- Valero, M., Panova, M., Mas-Coma, S., 2001. Developmental differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highlands and European lowlands. *Parasitol. Res.* 87, 337–342.
- Valero, M.A., Perez-Crespo, I., Periago, M.V., Khoubbane, M., Mas-Coma, S., 2009. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Trop.* 111, 150–159.
- Valero, A., Perez-Crespo, I., Khoubbane, M., Artigas, P., Panova, M., Ortiz, P., Maco, V., Espinoza, J.R., Mas-Coma, S., 2012. *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: Valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Inf. Gen. Evol.* 12, 403–410.
- Valle, C., Troiani, A.R., Festucci, A., Pica-Mattocchia, L., Liberti, P., Wolstenholme, A., Francklow, K., Doenhoff, M.J. and Cioli, D., 2003. Sequence and level of endogenous expression of calcium channel β subunits in *Schistosoma mansoni* displaying different susceptibilities to praziquantel. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 111–115.
- VICH, 2000. VICH Topic GL7 Efficacy of anthelmintics: general requirements. <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-efficacy/anthelmintics.html> Accessed 7th June 2017.
- Walz, Y., Wegmann, M., Dech, S., Raso, G., Utzinger, J., 2015. Risk profiling of schistosomiasis using remote sensing: approaches, challenges and outlook. *Parasites & Vectors* 8, 163.
- Wang, J., Zhou, S., 1988. The observation of praziquantel effecting on the tegumental ultrastructure of schistosomulae of *Schistosoma japonicum* *in vitro*. *Acta Hydrobiol. Sin.* 12, 286–288.
- William, S., Sabra, A., Ramzy, F., Mousa, M., Demerdash, Z., Bennett, J.L., Day, T.A., Botros, S., 2001. Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. *Int. J. Parasitol.* 31, 1093–1100.
- Williams, C.B., 1937. The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems. *Ann. Appl. Biol.* 24, 404–414.
- Williams, R.E., Ernst, I., Chambers, C.B., Whittington, I.D., 2007. Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriolae* and *Benedenia seriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Dis. Aquat. Org.* 77, 199–205
- Wotton, D.M., Murrell, K.D., 1967. *Ptryalincola ondatrae*, gen. et sp. n. (Trematoda: Brachylaimidae), a fluke inhabiting the salivary glands of muskrats. *J. Parasitol.* 53, 739–742.
- Xiao, S., Xue, J., Xu, L., Zhang, Y., Qiang, H., 2011. Comparative effect of mebendazole, albendazole, tribendimidine, and praziquantel in treatment of rats infected with *Clonorchis sinensis*. *Parasitol. Res.* 108, 723–730.
- Xiao, S.H., Yang, Y.Q., Shen, B.G., Xu, D.H., Yang, H.Z., Mei, J.Y., Yue, W.J., 1988. Effect of praziquantel on ultrastructure of *Schistosoma japonicum* cercariae and schistosomula within mouse skin. *Acta Pharmacol. Sin.* 9, 360–363.
- Xie, W., Han, C., Hou, J., Wang, F., Qian, Y., Xi, J., 2012. Simultaneous Determination of Multiveterinary Drug Residues in Pork Meat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Combined With Solid Phase Extraction. *J. Sep. Sci.* 35, 3447–3454.
- Yamaguti, S., 1958. *Systema Helminthum*. Vol. I. Digenetic Trematodes. Interscience Publications. Inc. New York-London, pp. 979.
- Yamaguti, S., 1971. Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Vol. I. Keigaku Publishing Co, Tokyo, Japan, pp. 1074.

- Yamaguti, S., 1975. A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Keigaku Publishing Co, Tokyo, Japan, pp. 590 + pl. 219.
- Zarnowski, E., 1960. Parasitic worms of forest micromammals (Rodentia and Insectivora) of the environment of Pulawy (district Lublin). II. Trematoda. Acta Parasitol. Pol. 8, 127-168.
- Zbikowska, E. 1998. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). Biol. Bull. Poznań. 35, 25–32.
- Zdarska, Z., 1994. Surface structures of *Brachylaimus fuscatus* (Digenea: Brachylaimidae) metacercaria. Folia Parasitol. 41, 51–54.
- Zdarska, Z., Soboleva, T.N., Valkounova, J., Sterba, J., 1991. Ultrastructure of the general body tegument of the trematode *Brachylaima aequans*. Helminthol. 27, 3–9.
- Zelmer, D.A., 2013. Estimating prevalence: a confidence game. J. Parasitol. 99, 386–389.
- Zhao, M., 2005. Specific method for determination of gefitinib in human plasma, mouse plasma and tissues using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 819, 7.

ABREVIATURAS

ADI: Acceptable Daily Intake (Ingesta Diaria Admisible)

CV: Coeficiente de Variación

DE: Desviación Estándar

EMA: European Medicines Agency (Agencia Europea del Medicamento)

MANOVA: Análisis Multivariante de la Varianza

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPLC-MS/MS: High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry–
Mass Spectrometry

LLOQ: Lower Limit Of Quantification

ULOQ: Upper Limit Of Quantification

PCA: Principal Component Analysis (Análisis de Componentes Principales)

PZQ: Praziquantel

SEM: Scanning Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Rastreo)

Syn.: Sinonimia

TEM: Transmission Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de
Transmisión)

VICH: International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for
Registration of Veterinary Medicinal Products

OTROS MÉRITOS

Pósters de congreso:

- Larval stages and VICH GL7: a mathematical approach for *Brachylaima* spp. parasitizing *Cornu aspersum*. L. Gállego and M. Gracenea. XX SOCEPA Congress and XV EVPC Meeting, Tenerife, 2017.
- HPLC-MS/MS sample preparation for quantification of praziquantel residue in an uncommon biological matrix: the edible snail *Cornu aspersum*. L. Gállego and M. Gracenea. 12th Annual LC/MS/MS Workshop on Environmental applications and food safety, Barcelona, 2016.

Comunicaciones orales en congresos:

- Controlled hibernation of the edible terrestrial snail *Cornu aspersum* (Helicidae) and infectivity of *Brachylaima* spp. (Digenea) metacercariae. Mercedes Gracenea and Laia Gállego. XX SOCEPA Congress and XV EVPC Meeting, Tenerife, 2017.
- Farming the edible terrestrial snail *Cornu aspersum* (Helicidae) and parasitization by *Brachylaima* spp. (Digenea) metacercariae. Mercedes Gracenea and Laia Gállego. XX SOCEPA Congress and XV EVPC Meeting, Tenerife, 2017.

Seminarios:

- Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae in terrestrial gastropods intended for human consumption. EMA/VICH requirements. Research Workshops 2016, Pharmacy and Food Science faculty of the University of Barcelona.