

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE
MEXICO

24
55

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE DIVERSOS PARAMETROS EN LA RELACION
PARASITO (*Fasciola hepatica*) - HOSPEDERO INTERMEDIARIO
(*Lymnaea columella*), PROVENIENTE DE DOS LOCALIDADES.

T E S I S

Que para obtener el titulo de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Sergio Endeje Mendoza

Director: Dr. Froylan Ibarra Velarde.

Asesor : M. en C. Mario Segura Alamaráz.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

No. de Pag.

RESUMEN

INTRODUCCION.....	1
IMPORTANCIA ECONOMICA.....	3
DISTRIBUCION GEOGRAFICA.....	4
BIOLOGIA DE <i>Fasciola hepatica</i>	5
a) TAXONOMIA.....	5
b) DESCRIPCION MORFOLOGICA	6
c) CICLO DE VIDA	7
HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS.....	10
a) TAXONOMIA.....	10
b) MORFOLOGIA.....	11
c) DISTRIBUCION	12
EPIZOOTIOLOGIA (con relación a los hospederos intermediarios)	19
RELACION PARASITO-HOSPEDERO INTERMEDIARIO.....	21
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	39

OBJETIVOS.....	45
MATERIAL Y METODO.....	45
RESULTADOS Y DISCUSION	54
CONCLUSIONES.....	80
LITERATURA CITADA.....	82

RESUMEN

Se efectuó un estudio del caracol Lymnaea columella como hospedero intermediario de la fasciolosis, considerando dos poblaciones diferentes provenientes de las localidades de Acambay-Edo. de México y Huauchinango-Puebla, para evaluar todos los parámetros resultantes en su infección con Fasciola hepatica a nivel experimental.

Se describe el índice de infección que presentaron y la producción de metacercarias tanto por liberación como en total de los caracoles experimentales pertenecientes a ambas localidades; también se menciona el rango de liberación obtenido por caracol liberador. Además se evaluó el comportamiento poblacional de los caracoles de ambas localidades en el periodo de infección, considerando el índice de mortalidad que presentaron por semana. Todo esto se realizó con el fin de determinar si los moluscos de ambas poblaciones presentan la misma susceptibilidad a la infección con Fasciola hepatica.

Así mismo, se evaluó la viabilidad e infectividad de las metacercarias obtenidas en las infecciones experimentales de Lymnaea columella. Se consideraron dos técnicas: in vitro (desenquistamiento mecánico) e in vivo (administrando las metacercarias a conejos experimentales).

Considerando las pruebas estadísticas o de significancia realizadas, se comprobó una diferencia importante a nivel experimental, en la relación de los caracoles (de ambas

localidades), con el tremátodo del hígado E. hepatica.

Lymnaea columella del Estado de Puebla resultó ser la población que presentó una mayor susceptibilidad a la presencia del parásito. La infectividad de las metacercarias obtenidas al infectar los caracoles experimentales presentó diferencias relativas.

Por lo anterior, se pudo determinar que al menos experimentalmente, existen diferencias muy relevantes en su respuesta como hospederos de la fasciolosis, entre ambas poblaciones del caracol L. columella.

INTRODUCCION

La fascioliasis, es una enfermedad parasitaria principalmente de los ovinos y bovinos, causada por el trematodo del higado denominado Fasciola hepatica, aunque tambien puede ser ocasionada por Fasciola gigantica en menor escala (48).

Esta enfermedad es cosmopolita en su distribucion y tambien puede existir en muchos otros animales que actúan como reservorios y diseminadores, a partir de los cuales puede transmitirse a las ovejas y al ganado vacuno. Entre estos otros hospederos están las cabras y otros rumiantes, el elefante, el canguro, el cerdo, la liebre, el conejo, el castor, el caballo, el perro, el gato y el hombre (53) (48). Esta parasitosis tambien ha sido encontrada en forma de epidemia entre los humanos especialmente en Inglaterra, Francia e Italia; asimismo se ha reportado en Sudamérica, América Central, Asia, Africa y Australia y se cree que es más común de lo que se había pensado (53).

En México, Fasciola hepatica es conocido con una gran variedad de términos tales como: distoma hepático, conchuela, duela del higado, palomilla, orejuela, arenilla, hilillo, caracuillo, conchilla, sanguijuela, acucuyachi, acocoyechic y cucuyache -estas tres últimas palabras derivan del vocablo azteca "acuecuyachin" que significa sanguijuela - (25) (59).

La fascioliasis se presenta en dos formas. La menos común es la fascioliasis aguda ("podredumbre hepática aguda") propia de las

ovejas. Se desarrolla rápidamente y puede aparecer en animales en aparente buena condición, puede matar a los animales en unos cuantos días (48) .

La otra forma es la fascioliasis crónica ("podredumbre hepática crónica") que es la más común. Resulta de la penetración lenta de metacercarias en el ganado vacuno y en las ovejas, aparece sólo cuando un número suficiente de fasciolas ha llegado a establecerse en el hospedero, causando tanto daño que los animales muestran síntomas claros de la enfermedad y en ocasiones llegan a morir (48).

Este trematodo es de particular importancia en los bovinos y ovinos, ya que en estas especies es responsable de pérdidas directas e indirectas, las cuales dependen de la intensidad de la infección. Las directas son causadas por la muerte repentina del animal, principalmente en ovinos, al aparecer bruscamente la enfermedad. Estas pérdidas ya considerables son superadas por las indirectas, que llegan a tener un mayor volumen económico y se dan en los animales con fascioliasis crónica que no muestran signos de la existencia del problema, aparte de los trastornos digestivos más o menos pronunciados. Estas pérdidas indirectas se manifiestan por disminución de peso en grado variable, anemia progresiva, mala conversión alimenticia con la conocida secuela de un síndrome de desnutrición, mal estado de la carne, decomiso de hígados cuando el animal es llevado al rastro, resequedad de la piel, mala calidad de la lana, baja producción de leche con lo

que se detiene el desarrollo de las crías y estas presentan poca ganancia en peso. También se observa disminución de la fertilidad, abortos y menor resistencia a otras enfermedades (95) (72) (57).

IMPORTANCIA ECONOMICA

Como parásito del ganado, Fasciola hepatica tiene gran importancia económica en todos los continentes. Por ejemplo en Australia, donde gran parte de la economía nacional depende del ganado ovino, la infección por este trematodo causó, durante 1976, pérdidas cercanas a los 20 millones de dólares (25).

En Puerto Rico en un cálculo reciente, hecho en 1981, las cifras de las pérdidas por decomiso de hígados a causa de esta trematodosis alcanzaron el monto de 1 millón de dólares anuales (56).

En Irlanda, el distoma hepático causa daños a la industria pecuaria por 10 millones de libras esterlinas anuales y en Gran Bretaña, por 50 millones (56).

En México, se han realizado algunos trabajos de investigación a nivel de rastro en diferentes regiones del país y estos dan sólo una ligera idea de las mermas que este parásito ocasiona en la industria pecuaria (56). Entre los años de 1965 a 1968, en uno de los principales rastros de la República, el de Ferrería, se decomisaron por Fasciola hepatica 52,404 hígados con peso

aproximado de 434,429 kg., que resultan en una pérdida directa de 760, 251 pesos (32).

En Tulancingo, Hidalgo, de octubre de 1974 a noviembre de 1975, se decomisaron a consecuencia de la fasciolosis, 5,806 kg. de hígado, representando una pérdida de 87,090 pesos (79).

En Toluca, un estudio de tres meses realizado en 1976 reveló pérdidas de 13,281 pesos por la incineración de 442,675 kg. de hígados afectados (35).

Durante 1979, se estimó que las pérdidas por decomiso de hígados en todo el Estado de Tabasco alcanzaron los 55,717,351.00 pesos (76).

Los datos anteriores sólo muestran un panorama general del impacto negativo en la economía de varios países, como consecuencia de ésta parasitosis (56). En la actualidad es difícil asignar una cifra concreta a las pérdidas económicas causadas en todo el mundo por la fasciolosis (66).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

La fasciolosis puede localizarse en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 4,200 metros s.n.m., incluyendo los más variados climas, sin embargo, se presenta regularmente en climas templados. Así, la enfermedad es prevalente en Europa, Norte América, Norte de Asia, Australia y Norte de Africa. También está presente en las montañas altas de Kenya, en Sudáfrica,

América Central y Sudamérica. La enfermedad también ocurre en algunas Islas, incluyendo Nueva Zelanda, Tasmania, Islandia, Chipre, Japón, Nueva Guinea, Las Filipinas y varias islas del Caribe (53).

Como resultado de su ubicación entre el Trópico de Cáncer y la zona ecuatorial, la República Mexicana posee una amplia variedad de climas donde las condiciones prevalentes favorecen la existencia de los hospederos intermediarios de Fasciola hepatica y por ende la presencia de la fasciolosis, la cual se encuentra distribuida desde los Estados que poseen clima cálido con lluvias la mayor parte del año y una temperatura media anual superior a 20°C como el caso de Tabasco, Veracruz, Campeche y Chiapas, hasta aquellos otros con clima desértico o semiárido con lluvias irregulares y escasas y temperatura media anual de 10 - 20°C como en algunas zonas de Coahuila, Durango, Mexicali y otros (59).

Se han encontrado solamente dos localidades libres de esta parasitosis, siendo estas: Saltillo en el Estado de Coahuila y Mérida en el Estado de Yucatán. Con este panorama se puede decir que en México prácticamente se ha encontrado ganado infectado en todo el país (55) .

BIOLOGIA DE Fasciola hepatica

a) TAXONOMIA

De acuerdo con Soulsby (87), Pantelouris (66), Yamaguti (106) y Najera (59), la posición taxonómica de Fasciola hepatica es la siguiente:

Phylum	:	Platyhelminthes	Gegenbaur, 1859
Clase	:	Trematoda	Rudolphi, 1808
Orden	:	Digenea	Van Beneden, 1858
Suborden	:	Prosostomata	Odhner, 1905
Superfamilia:		Echinostomatoidea	Railliet, 1895
Familia	:	Fasciolidae	(Linnaeus, 1758); Railliet, 1895
Género	:	Fasciola	Linnaeus, 1758
Especie	:	<u>Fasciola hepatica</u>	Linnaeus, 1758

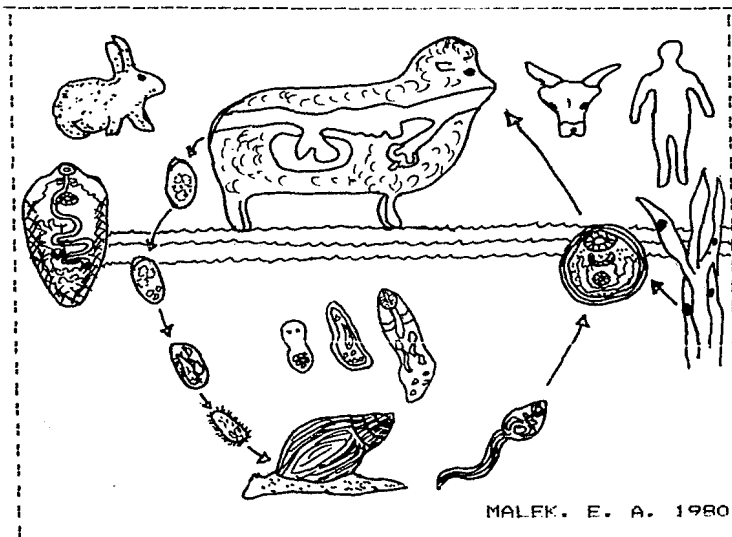
b) DESCRIPCION MORFOLOGICA

El distoma del hígado Fasciola hepatica es un tremátodo hermafrodita, caracterizado por un cuerpo largo en forma de hoja aplanado dorsoventralmente, de aproximadamente 30 x 10 mm; en su parte más anterior presenta un par de protuberancias conocidas como "hombros" unidas por un cono cefálico estrecho, situado sobre el extremo anterior ancho. Posee además dos ventosas muy próximas una de otra; la ventosa oral es más pequeña que la ventral y esta última se localiza a nivel de los anchos "hombros" (48) (62).

El parásito presenta grandes espinas a nivel de epidermis. Los ciegos intestinales sumamente ramificados se extienden hasta el extremo posterior del cuerpo. Un ovario con varias ramificaciones se localiza hacia el lado derecho, detrás y a corta distancia de la ventosa ventral. Los testículos están muy

ramificados, ocupando la mayor parte del cuerpo, detrás del ovario. Numerosas glándulas vitelógenas se extienden hacia atrás, a lo largo de los lados del cuerpo, desde los "hombros" hasta el extremo posterior donde confluyen detrás de los testículos (48) (62).

c) CICLO DE VIDA



FASCIOLAS ADULTAS.- Se encuentran alojadas en los conductos biliares de sus hospederos definitivos; eliminan gran cantidad de huevos, los cuales pasan con la bilis al intestino y salen al exterior con las heces fecales (59) (66).

HUEVOS.-

Son operculados, largos y ovoides; cada huevecillo mide en promedio $140 \times 75 \mu$; para su completo desarrollo es necesario que est n libres de heces, que exista una pequeña capa de humedad a su alrededor y una temperatura adecuada (el rango favorable es de 10 a 30°C), pero es sabido que a mayor temperatura disminuye el periodo de incubación (21) (42) (53). Permanecen viables en un rango de pH de $4.2-9.0$ (66). La buena oxigenación del agua favorece su desarrollo a temperaturas normales ($25-30^{\circ}\text{C}$), incidiendo directamente sobre el tiempo de incubación y la viabilidad del huevecillo, pero puede ser perjudicial a temperaturas altas (66). Tardan en desarrollarse de $10-15$ días en el agua a una temperatura óptima de 23 a 25°C y dan lugar entonces a la siguiente etapa de desarrollo: el miracidio (53).

MIRACIDIOS.- Es una larva c nica ciliada (66); mide aproximadamente $128 \times 25 \mu$ (21). Ya desarrollado, el miracidio es estimulado por la luz a liberar una enzima proteolítica que digiere la sustancia que forma el opérculo del huevecillo (42); la eclosión se lleva a cabo primeramente por la hipertonicidad del contenido del huevo y sólo secundariamente por la actividad muscular del propio miracidio (42). Nada activamente en zig-zag

con fototropismo positivo y presenta también geotropismo negativo (66) (21). En condiciones naturales se encuentran expuestos a diversos factores ambientales tales como: temperatura (los valores óptimos están entre 25-34 °C), Experimentalmente, las tasas de infección aumentan con la temperatura. El pH óptimo para una actividad prolongada es de 7 a 9, valores de 5 a 10 son letales (21). Se conocen dos parámetros importantes para tratar de evaluar su infectividad: los que nadan en círculos son usualmente no infectivos; la velocidad con que nada el miracidio después de emerger también es un buen indicador de su infectividad. (13) . Su vida libre es corta, en promedio de 6 u 8 horas, durante las cuales nadando tiene que ponerse en contacto y penetrar en un hospedero intermediario susceptible perteneciente a la familia LYMNAEIDAE, de lo contrario su actividad decrece con el tiempo y muere después de 12 a 24 horas (53) (21).

De acuerdo con el avance en el conocimiento de la biología de los tremátodos, es prácticamente imposible abordar el estudio de un ciclo biológico integralmente, pues el investigador se ve obligado a restringirse a un sólo aspecto del ciclo evolutivo, sea éste el huevo, las formas libres, las relaciones hospedero-parásito en el hospedero intermediario o en el hospedero

definitivo (21).

En el presente estudio se pretende analizar específicamente la relación parásito-hospedero intermediario; por consiguiente los estadios larvarios del parásito que se desarrollan dentro del caracol (esporocisto, redias, redias-hijas y cercarias) se describen posteriormente; asimismo, se incluye una descripción de la fase de metacercaria como resultado de esta relación.

HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

a) TAXONOMIA

La posición taxonómica de Lymnaea (Pseudosuccinea) columella de acuerdo con Burch (17) y Hubendick (37) es la siguiente:

	(17)	(37)
CLASE:	Gastropoda	Gastropoda
SUBCLASE:	Pulmonata	Pulmonata
ORDEN:	Limnophila	Saccommatophora
SUPERFAMILIA:	Lymnaeoidea	
FAMILIA:	Lymnaeidae	Lymnaeidae
SUBFAMILIA:	Lymnaeinae	
GENERO:	Pseudosuccinea	Lymnaea
ESPECIE:	<u>Pseudosuccinea columella</u>	<u>Lymnaea columella</u>

La malacólogos discrepan en cuanto a la posición taxonomica de los miembros de la familia LYMNAEIDAE (42). Esta discrepancia en criterios taxonómicos tiene su origen en una publicación de Hubendick (37), en donde este autor reduce todos los géneros de

caracoles gastrópodos pulmonados a uno sólo, Lymnaea, en base a datos morfológicos y requerimientos ecológicos. Hay algunos autores como Kendall (42), Taylor (91) y Boray (13) que adoptan este tipo clasificación. Otros autores como Jackiewicz (39) y Malek (51, 53) por el contrario siguen considerando géneros como Galba, Stagnicola, Fossaria y otros más, independientemente del género Lymnaea.

En el presente estudio se utilizó la clasificación de Hubendick (37) de acuerdo con la identificación de los caracoles realizada por el Dr. Wright (1979) del Departamento de Zoología del Museo de Historia Natural de Londres.

b) MORFOLOGIA

La descripción morfológica de la familia LYMNAEIDAE de acuerdo con Malek (51, 53) es la siguiente: concha dextrogira; espira más o menos atenuada y variando considerablemente en lo alto. El eje columelar gira típicamente (circulando alrededor en un espiral) o torcido; la concha varía en espesor y tamaño de la espira. Los tentáculos son aplanados y triangulares (no filiformes). El diente central de la rádula es unicúspide, la dentición lateral es bi o tricúspide y los marginales son multicúspides o serrados. El riñón es largo, amplio y en forma de pera; el ureter va directamente hacia adelante sin pliegues, no presentan pseudobranquias, el orificio genital y el ano están en el lado derecho.

c) DISTRIBUCION

Las especies de caracoles involucrados en el ciclo de vida de Fasciola hepatica varían según las regiones (59), pero lo cierto es que la distribución cosmopolita de la fasciolosis corresponde a la de los caracoles pulmonados, principalmente de la familia LYMNAEIDAE, que bajo condiciones óptimas de humedad y temperatura actúan como hospederos intermediarios del parásito (72).

A continuación, respetando el criterio de cada uno de los autores de las publicaciones consultadas, se presenta una recopilación de las distintas especies de caracoles que han sido citados como hospederos intermediarios de Fasciola hepatica. Esta recopilación fue elaborada por continentes; además se realizó otra con reportes específicos para México. Cabe mencionar que debido a la existencia de diferentes corrientes o escuelas taxonómicas, una misma especie puede ser denominada con distintos nombres. Por ejemplo, la especie Lymnaea (Pseudosuccinea) columella es considerada así según Ponder (68) y Malek (53), o bien como Lymnaea columella por Hubendick (37) y Harris (34) o como Pseudosuccinea columella por Malek (51) y Burch (17).

HOSPEDEROS EN AMERICA

Lymnaea humilis (55) (46) (93) (65) (92) (94) MEXICO

Lymnaea humilis (66) CANADA

Fossaria (F) humilis (20) MEXICO

Lymnaea (Fossaria) bulimoides (66) NORTEAMERICA

Galba bulimoides (83) OREGON-U.S.A.

Galba bulimoides techella (86) LOUISIANA-U.S.A.

Stagnicola bulimoides techella (61) TEXAS-U.S.A.

Fossaria bulimoides techella (69) U.S.A.

Stagnicola bulimoides (51) U.S.A.; (59) COLORADO, NORTE DE
 NUEVO MEXICO Y ARIZONA-U.S.A

Lymnaea bulimoides (47) WASHINGTON-U.S.A.; (46) (93) (94)
 MEXICO.

Limnaea (F) ferruginea (84) NORTEAMERICA

Fossaria ferruginea (69) U.S.A.

Fossaria modicella (44) NORTEAMERICA; (69) (51) U.S.A.;
 (104) COLORADO, NORTE DE NUEVO MEXICO
 Y ARIZONA-U.S.A.

Limnaea modicella modicella (47) WASHINGTON-U.S.A

Lymnaea modicella (Fossaria modicella) (103) QUEBEC-CANADA

Limnaea traskii (45) FLORIDA-U.S.A.; (69) U.S.A

Fossaria cubensis (99) FLORIDA-U.S.A.; (36) SUR DE U.S.A (69)
 U.S.A.; (51) PUERTO RICO Y LOUISIANA;
 (53) LOUISIANA, FLORIDA Y PROBABLEMENTE
 OTROS ESTADOS DEL GOLFO DE MEXICO,
 ADEMAS VENEZUELA.

Fossaria (Backerilymnaea) cubensis (81) MEXICO

Limnaea cubensis (75) VENEZUELA; (59) BRASIL

Lymnaea cubensis (91) SURESTE DE U.S.A, MEXICO Y LAS ISLAS
 DEL CARIBE; (27) PUERTO RICO; (96)

REPUBLICA DOMINICANA; (97) ALTIPLANO DE
BOLIVIA; (46) (92) (59) (28) (93) (94)
MEXICO.

Lymnaea (Galba) cubense (31) MEXICO

Lymnaea attenuata (3) (92) (28) MEXICO

Lymnaea attenuata (1) (59) MEXICO

Stagnicola attenuata (20) MEXICO

Lymnaea viator (5) URUGUAY; (89) CHILE

Lymnaea viatrix (66) ARGENTINA Y CHILE; (51) ARGENTINA;
(97) ALTIPLANO DE BOLIVIA; (53)
ARGENTINA, CHILE, PERU, BRASIL.

Lymnaea bogotensis (58) (51) (53) COLOMBIA

Lymnaea obrussa (54) (93) (94) MEXICO

Lymnaea diaphana (91) ISLAS MALVINAS

Lymnaea palustris nataliana (47) WASHINGTON-U.S.A

Lymnaea palustris (93) MEXICO

Stagnicola palustris (104) COLORADO, NORTE DE NUEVO MEXICO Y
ESTE DE ARIZONA

Lymnaea proxima proxima (47) WASHINGTON- U.S.A

Lymnaea stagnalis wasatchensis (47) WASHINGTON-U.S.A

Lymnaea tomentosa (59) COLOMBIA Y ECUADOR

Lymnaea coussini (59) COLOMBIA Y ECUADOR

Pseudosuccinea columella (43) FLORIDA-U.S.A; (69) U.S.A

Lymnaea (Pseudosuccinea) columella (14) COSTA RICA; (103)
QUEBEC-CANADA

Lymnaea columella (27) PUERTO RICO; (92) (59) (93) (60)
MEXICO; (53) VENEZUELA Y COLOMBIA;

HOSPEDEROS EN EUROPA

(*) Lymnaea truncatula (49) FRANCIA; (78) ESPAÑA Y PORTUGAL;
(7) ALEMANIA; (7) AUSTRIA; (63)
INGLATERRA

(*) Galba truncatula (6) POLONIA

(*) Fossaria truncatula (51) EUROPA

(*) Por su distribución, el hospedero más importante de
Fasciola hepatica en Europa; se citan sólo algunos
reportes.

Lymnaea peregra (90) ESCOCIA; (78) ESPAÑA Y PORTUGAL

Lymnaea stagnalis (78) ESPAÑA Y PORTUGAL

Lymnaea palustris (78) ESPAÑA Y PORTUGAL

Lymnaea glabra (78) ESPAÑA Y PORTUGAL

HOSPEDEROS EN ASIA

Lymnaea peruvia (85) (51) (66) JAPON

Limnaea peruvia (40) CHINA

Levia amniata (66) JAPON e INDIA

Limnaea acuminata (88) INDIA

Limnaea japonicum (51) JAPON

Limnaea luteola (88) INDIA

Limnaea ollula (66) (101) JAPON

Limnaea philippinensis (26) ISLAS FILIPINAS

Limnaea philippensis (51) ISLAS FILIPINAS

Limnaea swinhoei (51) ISLAS FILIPINAS

Limnaea truncatula (100) (66) (91) ASIA; (88) INDIA; (38)
COMO UN NUEVO REGISTRO EN JAPON;
(67) RUSIA; (74) IRAN

Fossaria truncatula (51) ASIA CENTRAL, ASIA DEL ESTE Y ASIA
MENOR

Limnaea rubiginosa (51) MALAYA

Limnaea palustris (74) IRAN

Limnaea gedrosiana (74) IRAN

HOSPEDEROS EN AFRICA

Limnaea natalensis (19) (66) CONGO y UGANDA; (33) TANGANIKA-
AFRICA

Limnaea muervensis (66) MONTANAS DE KENIA

Limnaea mudervensis (42) KENIA; (91) ETIOPIA Y SUDAFRICA

Limnaea truncatula (91) ETIOPIA Y SUDAFRICA; (42) KENIA

Fossaria truncatula (51) AFRICA DEL NORTE Y EGIPTO

Limnaea columella (98) SUDAFRICA

HOSPEDEROS EN OCEANIA

Limnaea tomentosa (8) (13) (34) AUSTRALIA Y NUEVA ZELANDA;

(12) (50) (34) AUSTRALIA; (15)
(34) ISLA NORTE e ISLA SUR DE
NUEVA ZELANDA; (13) TIERRAS
ALTAS DE NUEVA GUINEA.

Lymnaea tenuistriatus (51) AUSTRALIA

Lymnaea tasmanica (Lymnaea brazieri; Lymnaea subaquatilis;
Lymnaea laucestonensis) (91) AUSTRALIA

Lymnaea truncatula (18) ISLA SUR DE NUEVA ZELANDA

Lymnaea columella (70) (18) (34) NUEVA ZELANDA; (24) AUSTRALIA

Lymnaea (Pseudosuccinea) columella (68) AUSTRALIA

HOSPEDEROS EN LA REPUBLICA MEXICANA

Limnaea attenuata (1) LAGO DE TEXCOCO-EDO. DE MEXICO; (59)
CHALCO, LERMA Y ALPEDEROS DE LA CIUDAD DE
MEXICO

Lymnaea attenuata (92) PUEBLA; (28) VALLE DE TOLUCA; (3)
LAGUNA DE SAN GUILLERMO, TULANCINGO-HGO.

Stagnicola attenuata (20) TULANCINGO, HGO.

Lymnaea obrussa (54) RIO SABINAS-COAHUILA Y ACEQUIAS DEL EDO.
DE DURANGO; (93) (94) DURANGO.

Lymnaea humilis (55) EN UNA ACEQUIA DE LA CIUDAD DE
HERMOSILLO-SONORA; (46) TULANCINGO-
HIDALGO; (92) PUEBLA; (65) JALAPA-
TABASCO; (93) (94) DURANGO

Fossaria (F) humilis (81) ATLASCATEPEC-TLAXCALA

Lymnaea (galba) cubense (31) TEPOTZOTLAN Y TEXCOCO-EDO.
DE MEXICO

Lymnaea cubensis (92) PUEBLA; (46) TULANCINGO-HGO.; (59)
VERACRUZ; (28) VALLE DE TOLUCA; (93) (94)
DURANGO

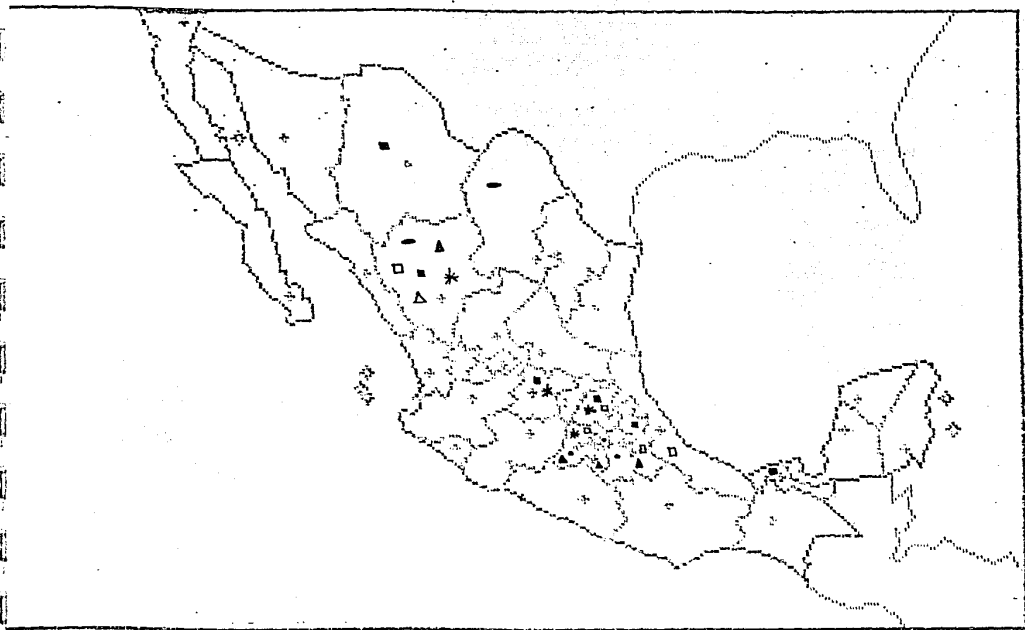
Fossaria (Backerilymnaea) cubensis (81) ATLANGATEPEC-TLAX.

Lymnaea columella (92) PUEBLA; (93) DURANGO; (59) ALGUNAS
ZONAS DEL GOLFO DE MEXICO; (60)
JIUTEPEC, XOCHITEPEC Y TETECAL-
EDO. DE MORELOS; ACAMBAY-EDO. DE
MEXICO Y HUAUCHINANGO-PUEBLA
(experiencia personal).

Lymnaea palustris (93) DURANGO

Lymnaea bulimoides (46) TULANCINGO-HGO;
(93) (94) DURANGO; ZONA NORTE DEL ESTADO
DE MEXICO; MUNICIPIO DE TEMASCALCINGO Y
MUNICIPIO DE JOCOTITLAN. (Castrujón G.
D., Comunicación Personal).

POSIBLE DISTRIBUCION DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS DE Fasciola hepática en la REP. MEXICANA. (Sólo se señalan los estados en donde existen reportes, no así lugares específicos de localización de cada hallazgo).



- Lymnaea attenuata.
- Lymnaea humilis.
- ▲ Lymnaea columella.
- * Lymnaea bulimoides.
- Lymnaea obrussa.

- Lymnaea cubensis
- △ Lymnaea palustris

EPIZOOTIOLOGIA (con relación a los hospederos intermediarios).

Algunos de los factores importantes en el ciclo de vida de Fasciola hepatica y la epizootiología de la fascioliasis son: la presencia de mamíferos herbívoros infectados, la presencia de caracoles hospederos apropiados, clima, temperatura, humedad, composición química del suelo, flora acuática y un apropiado suministro de agua (53). En relación a los factores ecológicos predominantes para el establecimiento de zonas endémicas de fascioliasis, son muy característicos, pues la ausencia de uno de ellos basta para que la parasitosis no exista en el medio. Estos factores pueden dividirse en dos grupos: abióticos y bióticos. Los primeros son todos aquellos relacionados con el clima, precipitación pluvial, presión, temperatura, pH y consistencia del suelo; mientras que los segundos están integrados por la flora y la fauna, que, vinculados con los abióticos ya mencionados forman el ecosistema donde se desarrollan adecuadamente aquellas fases del ciclo vital del parásito que requieren del concurso de la naturaleza para persistir (59).

Los hospederos intermediarios de Fasciola hepatica son caracoles anfíbios, que viven en el lodo o a orillas del agua, (Lymnaea truncatula) y otros acuáticos (Pseudosuccinea columella). Sin embargo, estos caracoles raramente llegan a vivir en aguas con flujo pronunciado y nunca en aguas muy profundas (42) (53); tienen una reproducción vigorosa sobre todo en los nuevos establecimientos o hábitats (74).

Un factor importante y decisivo para el hábitat es el tipo de

suelo, éste es idóneo cuando retiene la humedad y tiene además un contenido de sales, preferentemente de calcio; también es importante la textura pues una superficie lisa y consolidada favorece el desarrollo de las microalgas con que se alimentan (91).

Se ha sugerido que la distribución de los caracoles puede estar determinada por el pH del suelo. El rango de pH favorable parece estar entre 6 y 9 (82). Un ejemplo es el caracol hospedero norteamericano Stagnicola bulimoides teghella que está restringido a suelos de pH 7.1-8.4 (66) .

Cuando no existe la humedad necesaria u otras condiciones favorables, un caracol puede entrar en estivación, es decir, permanece metabólicamente inactivo, no crece ni se reproduce; esto sucede por lo regular en épocas de sequía (64); por ejemplo Lymnaea truncatula en Inglaterra llega a sobrevivir por un año en un hábitat seco (41); son capaces de reproducirse rápidamente y formar grandes colonias cuando regresa la humedad o presencia de agua (53); por otra parte, sobreviven a bajas temperaturas en el lodo o hielo (74); en general son bastante tolerantes a condiciones adversas (64).

Otros factores físicos que influyen directa o indirectamente en la presencia o ausencia de hospederos intermediarios en ciertos hábitats son: luz, Lymnaea truncatula no se encuentra en lugares oscuros ni con mucha sombra debido a la incapacidad de las microalgas para crecer en estos sitios (91). La temperatura es el factor que rige la velocidad de desarrollo y el número de

individuos en las poblaciones de caracoles; en los meses de verano, los hospederos intermediarios se multiplican extraordinariamente; el frío, además del efecto directo en el caracol también actúa al impedir el crecimiento de microalgas en el hábitat (91).

La presencia de caracoles hospederos no está necesariamente asociada con la prevalencia de Fasciola hepatica; en Finmark (Noruega) por ejemplo, Limnaea truncatula está presente pero la fascioliasis es rara (66). En Estados Unidos, a pesar de existir las condiciones favorables para los hospederos intermediarios a lo largo de la costa oriental, la enfermedad existe sólo en Florida, aunque es abundante en otros estados de la Unión Americana (66).

RELACION PARASITO-HOSPEDERO INTERMEDIARIO

Para que el ciclo biológico de Fasciola hepatica se lleve a cabo y por ende exista la fascioliasis, se requiere de un hospedero intermediario, caracol perteneciente a la familia LYMNAEIDAE (2). La fase de desarrollo del parásito que inicia esta relación es el miracidio. Se han descrito varios patrones de comportamiento de los miracidios de todos los tremátodos. El más importante corresponde a la búsqueda y "encuentro" del hospedero intermediario por parte del miracidio, el cual es atraído por estímulos químicos, provenientes de los moluscos. No se ha comprobado que estos estímulos sean específicos para una especie de caracol en relación con el miracidio de una especie de tremátodo determinada (105) (21); este patrón de comportamiento,

en condiciones naturales, se ve influenciado por diversos factores ambientales (21).

Mediante ciertos tropismos que posee el miracidio y la atracción química ejercida por el caracol, penetra a través de las partes blandas del molusco (42) (59). (De acuerdo con Neuhaus 1953 citado por (42), se da una reacción quimiotáctica positiva por el miracidio a Lymnaea truncatula a una distancia de 15 cms); los miracidios que penetran a través del pie del caracol degeneran en un día, mientras que los que entran por los tejidos blandos si tienen un desarrollo posterior (66). Es necesaria una gran densidad de caracoles para que existan muchas posibilidades de que el miracidio localice al caracol (75). El ataque inicial, es probablemente por la acción succionaria de la papila anterior ayudándose para su adhesión del mucus que secreta el caracol. Una vez que el ataque se ha establecido, se da una perforación en el integumento del caracol y hay separación de las células epiteliales del manto (42). Ya dentro del caracol, el miracidio pierde su cubierta ciliada y su forma elongada para convertirse en esporocisto (66).

Según Roberts (77), la superficie del pie y del manto son probablemente los sitios predilectos para el desarrollo de los esporocistos, pero se ha observado que los esporocistos jóvenes tienen la habilidad para desarrollarse en una variedad de sitios dentro o fuera de los tejidos del hospedero (42). Frecuentemente se ha sostenido que es el esporocisto joven y no el miracidio el que penetra en el cuerpo del caracol (22). El esporocisto se

desarrolla a partir de cada miracidio cerca del sitio de penetración; forma redias en aproximadamente dos o tres semanas usualmente en el borde del manto, el riñón y el área esofageal, éstas se mueven activamente y migran hacia el área distal del caracol; pueden ser localizadas principalmente en la glándula digestiva o "higado" del caracol hospedero alrededor del día 14 postinfección. En el interior del cuerpo de la redia se produce el siguiente estado, la cercaria, aproximadamente por el día 20. Bajo ciertas condiciones medioambientales la redia puede producir dentro de si misma una segunda generación de redias (redias hijas), esto pospone la producción de cercarias y adiciona todavía otra generación larval (46) (53). Se ha sugerido que la formación de una segunda generación de redias está determinada por la condiciones externas, puesto que las redias se forman en tiempos fríos y las cercarias en tiempos cálidos (53). Un dato importante que apoya lo anterior es, que en caracoles Lymnaea truncatula infectados con Fasciola hepatica y mantenidos bajo condiciones de laboratorio, nunca hubo un mínimo indicio de la producción de redias hijas. Bajo esas condiciones las redias proceden directamente a la formación de cercarias (42). En el caso de una segunda generación de redias, ambos tipos de larvas pueden ser encontrados en una misma redia. La cercaria producida en la primera o segunda generación de redias, abandona la redia y después el caracol a través de la cavidad pulmonar, en cualquier momento, pero usualmente en las últimas horas de la tarde o en la noche (53) .

Es importante señalar, antes de discutir que factores condicionan el desarrollo del parásito dentro del caracol, cuales son los posibles daños más importantes que causa el parásito en su migración y desarrollo dentro de su hospedero intermedio.

El daño que causan las larvas del parásito es usualmente mecánico y fisiológico así como en algunas ocasiones morfológico. El daño mecánico es producido cuando los estadios larverios migran a través de los varios tejidos en dirección de los órganos distales del caracol (51).

Algunos esporocistos y también ciertas redias infringen daño mecánico en los órganos distales. Los efectos del daño fisiológico son causados cuando las larvas consumen material nutritivo y lo absorben; el grado de estos efectos depende de si la infección es leve o drástica y por la acumulación en grandes cantidades de productos tóxicos excretados por el parásito (51).

De esta manera, entre los efectos dañinos que han sido estudiados en Lymnaea truncatula infectado con Fasciola hepatica, los más marcados son: crecimiento severamente retardado, las conchas son anormalmente transparentes, careciendo o perdiendo parcialmente su pigmentación; las espiras de la concha se ven como distorsionadas y los caracoles parecen letárgicos, sufriendo severamente los efectos del parásito (42). Se ha indicado que los estadios finales de desarrollo del parásito y particularmente la emergencia de las cercarias, son los que causan mayor daño y tal vez ésta sea la razón por la que se puede presentar una excesiva mortalidad de los caracoles en esta etapa de la infección (42). Experimentalmente se ha demostrado que manteniendo los caracoles

a temperaturas más bajas de las ideales para su desarrollo pueden presentar regeneración de tejidos dañados y pérdida de la infección, suprimiéndose el desarrollo del parásito por condiciones marcadamente desfavorables; esto ocurre sólo cuando se trata de infecciones normales (42).

El desarrollo partenogenético de Fasciola hepatica en sus caracoles hospederos es afectado por el medio ambiente (53); de hecho la viabilidad, infectibilidad y patogenicidad de las metacercarias puede depender de los factores ambientales que rodean el desarrollo intramolusco (9). Así, se ha demostrado que existe una relación directa entre el grado de desarrollo del parásito y la temperatura medioambiental del hospedero. El periodo de incubación del parásito en el caracol varía de acuerdo con varios autores (42) (53). En Lymnaea truncatula infectado con Fasciola hepatica a 25°C se encontró un esporocisto en el tercer día, redias en el séptimo día y las cercarias fueron liberadas a los 38 días después de la infección (77). En Australia Boray (10), ha hecho observaciones acerca del desarrollo de Fasciola hepatica en Lymnaea tomentosa y ha reportado la duración del mismo a diferentes temperaturas de 15 a 35°C; señala de 56 a 86 días a 15°C y de 24 a 28 días a 35°C (una temperatura muy alta para un caracol hospedero de Fasciola hepatica). También se ha demostrado en Lymnaea tomentosa (10) y Lymnaea truncatula infectados con Fasciola hepatica que abajo de los 10 °C no ocurre un desarrollo apreciable de los estadios larvarios, sobreviviendo éstos hasta por 100 días sin causar un

daño aparente al caracol; arriba de esta temperatura el desarrollo se incrementa hasta casi los 28°C cuando ya es difícil mantener al caracol en buena condición; además existe un periodo mínimo requerido para completar el ciclo de vida en el caracol que es del orden de 21 días aproximadamente a 27°C y finalmente con Fasciola hepatica no hay evidencia de que algunos estadios de desarrollo en particular sean más afectados por cambios en la temperatura que otros (42).

Algunos autores como Rose (1930) y Krull (1941) citados por Kendall (42), han sugerido que otros factores, además de la temperatura, están involucrados en el desarrollo del parásito dentro del caracol, al observar que el tiempo necesario para el desarrollo completo de las cercarias de Fasciola hepatica muestra una considerable variación en caracoles individuales infectados a un mismo tiempo y mantenidos bajo la misma temperatura.

Se ha observado, que un gran número de cercarias emerge más frecuentemente de los caracoles que crecen rápidamente durante el periodo posterior a la infección y al parecer el número de cercarias que maduran puede estar relacionado con la cantidad de alimento que está disponible para la redia (y al número de éstas) a través de los tejidos del caracol; de esta manera se establece una competencia por el alimento dentro del hospedero (42).

El tamaño de los caracoles (como un indicador de su nutrición) y no su número parece ser el principal factor que determina el número de parásitos presentes, según se ha demostrado con caracoles de la especie Lymnaea truncatula observadas en su

hábitat, el tamaño de estos correlaciona con la incidencia de infección por Fasciola hepatica en el ganado. En un hábitat donde la mayoría de los caracoles permanecen pequeños, la población de parásitos también es baja; en un hábitat donde están presentes caracoles grandes, la intensidad de la infección y el número de metacercarias sobre la hierba es grande (42).

Cabe señalar que caracoles de todos los tamaños ya sea bien o mal alimentados pueden ser susceptibles a la infección, así el subsecuente desarrollo del parásito está en función del estado nutricional del caracol (42). La relativa escasez o abundancia de alimento puede ocurrir en el campo, dependiendo de la densidad de las poblaciones de caracoles (13). Autores como Boray (10) señalan que poblaciones densas o pequeñas, pueden producir números similares de metacercarias.

Cuando un caracol entra en estivación obviamente retarda el desarrollo del parásito, a tal grado, que el efecto aparece más marcado cuanto mayor es éste período de inactividad del caracol (64) (42). Observaciones posteriores en infecciones avanzadas sugieren que el desarrollo de las cercarias no sólo es retardado durante la estivación del caracol sino que un gran número de cercarias maduras desaparece, presumiblemente mueren y son absorbidas. En este contexto los efectos de la estivación del caracol hospedero sobre el parásito pueden considerarse como un caso especial de los efectos de malnutrición (42).

Las cercarias liberadas por los caracoles hospederos se enquistan rápidamente en la vegetación acuática: pasto, palos o cualquier

objeto flotante, o con frecuencia libremente en el agua y la mayoría coloniza la parte más profunda del agua. Las metacercarias enquistadas son resistentes y permanecen viables por un largo periodo pero son destruidas por excesivo calor y sequedad (53). Los hospederos mamíferos incluyendo los humanos contraen la infección consumiendo vegetación acuática con metacercarias o bebiendo el agua contaminada de los hábitats de los caracoles conteniendo las metacercarias (53).

Ahora bien, existen otros aspectos importantes vinculados estrechamente a la relación parásito-hospedero intermediario; para que E. hepatica ataque a sus hospederos intermediarios, debe existir la especificidad necesaria para establecer la relación parásito-caracol (42); la atracción de los miracidios a un caracol específico, no está relacionada a la compatibilidad subsiguiente (53); es así como existen razas o rasgos fisiológicos en los parásitos que se pueden apoyar en base a la variación de la capacidad de infectar a diferentes caracoles hospederos; en muchos casos, esas diferencias son tan marcadas que es inevitable asociarlas con diferencias en la morfología del parásito. Un dato importante referente al hecho anterior es que en Japón hay evidencias de la existencia de una cepa de Fasciola hepatica fisiológicamente diferente a la europea y esto conduce a diferencias en la susceptibilidad que presenta a la infección Lymnaea ollula, con miracidios del trematodo (42).

La variación en la susceptibilidad a la infección de caracoles limneidos puede estar determinada por las condiciones

medioambientales de un caracol, por factores inmunológicos, genéticos y por el tiempo de exposición a los miracidios (29) (42). Pero además existe otro factor que recibe una considerable atención: la edad del caracol con relación al tiempo de exposición a la infección. Según se ha demostrado con *Schistosomas*, caracoles de todas las edades pueden ser susceptibles pero la maduración de las cercarias depende de un tiempo suficiente y también, de un suplemento suficiente de alimento. Así caracoles pequeños y sin alimento suficiente pueden ser incapaces de soportar el desarrollo normal del parásito; de la misma forma se sabe que cuando miracidios de *E. hepatica* atacan a *L. stagnalis* de todos tamaños, la infección no persiste en los caracoles viejos y grandes, las redias se desarrollan sólo en caracoles pequeños en donde si alcanzan a madurar (42). Más recientemente, se ha evaluado en forma experimental la edad propicia de los caracoles *L. humilis*, *L. cubensis* y *L. bulimoides* para ser infectados bajo condiciones de laboratorio, utilizando dos técnicas de infección (masiva e individual) y determinando también la susceptibilidad de las tres especies de caracoles a la infección con miracidios de *E. hepatica* (80). Se determinó que a las dos semanas de edad es cuando se infectan mejor las tres especies de caracoles, independientemente del método de infección utilizado; *L. humilis* resultó ser la especie más susceptible a la infección, con mayor número de caracoles liberadores y mayor número de metacercarias liberadas (80). Sin embargo, infectando estas mismas especies a 2, 4 y 6 semanas de edad no se han

encontrado diferencias en el porciento de viabilidad de las metacercarias obtenidas (30).

También es importante considerar la resistencia del caracol hospedero a ser infectado por E. hepatica. Pueden existir barreras para una infección inicial que están determinadas por respuestas o mecanismos fisiológicos propios del caracol para contrarrestar la presencia de E. hepatica como ha sido demostrado en el caracol L. stagnalis (42). Por otra parte, una vez infectado el caracol, se presentan barreras que interfieren con el desarrollo posterior del parásito, por lo regular en caracoles que no son hospederos comunes de E. hepatica (42). La infección múltiple de un caracol puede ocurrir pero con miracidios de un solo tremátodo, considerándose como una infección normal un número de 4 a 5 miracidios; cuando existen infecciones múltiples hay más posibilidad de que exista alta mortalidad entre los caracoles infectados. Observaciones en el campo han demostrado que infecciones simultáneas con más de una especie de tremátodo no se presentan con mucha frecuencia; por lo regular se presenta un mecanismo de resistencia dentro del caracol para no ser parasitado por una segunda especie de tremátodo (42).

En el transcurso de la infección de hospederos intermedarios por E. hepatica, no todas las cercarias maduran al mismo tiempo dentro de un solo caracol y además la emergencia de éstas fuera del caracol no es un proceso continuo (42). Existen ciertos factores importantes que determinen casi en su totalidad la liberación de las cercarias. Por ejemplo, se ha demostrado que

el rango de temperatura apropiado para emergencia es de 10 a 26 C (42); la producción de metacercarias en L. truncatula no puede realizarse a temperaturas superiores a 28°C (13), además se ha demostrado que L. tomentosa es más adaptable a altas temperaturas. Sin embargo, Boray (9), ha observado que altas temperaturas durante el desarrollo pueden afectar o modificar la viabilidad de las metacercarias. La luz no es un factor muy importante ya que la emergencia puede ocurrir en el día o en la noche (42). Experimentalmente se ha demostrado que el principal factor que determina la emergencia de las cercarias es la inmersión de los caracoles en agua limpia, la cual debe ser cambiada frecuentemente y además, que el recipiente que contenga el agua sea grande ya que un espacio restringido inhibe la emergencia (42).

La metacercaria como resultado de la relación parásito-hospedero intermediario, representa una fase de desarrollo con una considerable potencialidad de sobrevivencia y el promedio de vida de éstas puede ser determinado de acuerdo a las condiciones medioambientales (42).

Generalmente se ha creído que son necesarios varios días después del enquistamiento de las metacercarias para que éstas alcancen su completa infectividad en los hospederos definitivos (13). En trabajos como el de Dawes y Hughes (23) se ha encontrado que metacercarias de 2 días son infectivas. Por otra parte Boray (9), ha encontrado que las cercarias no son infectivas antes o inmediatamente después de su enquistamiento, pero que son

completamente infectivas 24 horas después de haberse enquistado. No se han encontrado diferencias en la viabilidad de grupos de metacercarias envaluadas 2, 5, 8, 16 y 30 días después del enquistamiento (13).

La sobrevivencia de las metacercarias enquistadas en la hierba sirve para mantener el ciclo de vida del parásito durante los periodos que son difíciles para la producción de cercarias. Una revisión de la literatura muestra que las metacercarias pueden sobrevivir por largos periodos, pero no hay evidencias del efecto de temperaturas abajo de 0°C y muy poca información de su resistencia a temperaturas arriba de 25°C (12). Estos mismos autores han estudiado la sobrevivencia e infectividad de las metacercarias de E. hepatica producidas bajo condiciones estándar y expuestas a diferentes temperaturas y humedades relativas. Los resultados obtenidos indican que las metacercarias de E. hepatica pueden sobrevivir durante las condiciones usuales de invierno en Australia y aún en los países fríos de Europa, particularmente cuando las pasturas infectadas son cubiertas por la nieve. Las metacercarias son más susceptibles a la desecación que al enfriamiento. El enfriamiento no puede destruir a las metacercarias, pero aparentemente causa cambios irreversibles que las hacen incapaces de infectar a los hospederos definitivos (13). Una alta proporción de metacercarias de E. hepatica son viables e infectivas por lo menos 130 días a 10 °C, 36 días a 25 °C y 14 días a 30°C. Casi el 50% de las metacercarias sobreviven por 60 días a 25°C y por lo menos el 20% por 36 días a 30°C. Las

metacercarias mueren cuando se mantienen a 35°C por 14 días (13). Uno de los aspectos experimentales más importantes, relacionado con la fasciolosis, que se desarrolla en varios laboratorios del mundo (incluido el PROYECTO FASCIOLASIS DEL INIFAP), es el que se refiere a la producción de metacercarias (13). Los elementos básicos de un método estándar para lograr una uniformidad razonable han sido descritos por Boray (9). El método se divide en etapas para eliminar variables en el cuidado de los caracoles durante la infección considerando el mantenimiento de los cultivos a temperatura constante y usando una dieta estándar; de esta manera se pueden recuperar un gran número de parásitos de los animales experimentales que han sido infectados con las metacercarias para completar experimentalmente el ciclo biológico del parásito (13).

Se detalla el método estándar de producción de metacercarias bajo condiciones de laboratorio citado por Boray (9) con el propósito de analizar respecto a esta técnica ya establecida algunos aspectos del método experimental empleado en la presente investigación y los resultados que de ella se obtuvieron.

- 1.- Selección de cepas o poblaciones de caracoles: pueden usarse cepas altamente susceptibles a la infección por E. hepatica adaptadas a las condiciones de laboratorio. Estas cepas son seleccionadas en el laboratorio. Estos caracoles producen mucho más metacercarias que los caracoles colectados en el campo o que provienen de su primera progenie.

2.- Origen de los miracidios: la bilis de la vesicula biliar puede ser obtenida de bovinos infectados artificialmente con metacercarias en el laboratorio (lo que se conoce como cepa o poblaci3n homogénea de bovinos); la bilis se colecta y es decantada varias veces. Los huevecillos en el agua son colocados en cajas de petri estériles con pintura plástica negra en su exterior para que los huevecillos sean incubados en completa obscuridad. Las cajas se llenan con agua aireada y conteniendo sólo una capa de huevecillos debido a que muchas pueden retardar su desarrollo. Los huevecillos son incubados a 26°C por doce días y usados inmediatamente para la infecci3n.

3.- Fase de infecci3n: caracoles de 4 a 6 semanas de edad (4-6 mm), son colocados en cajas de petri desechables en grupos de 10. Las cajas se llenan hasta casi su totalidad de agua destilada, y aproximadamente 20 huevecillos que dan origen a miracidios son adicionados por cada caracol. Las alicuotas son utilizadas para determinar el número de miracidios en el agua antes de la infecci3n. También pueden infectarse añaadiendo el número requerido de miracidios en las cajas conteniendo los caracoles. El éxito de la infecci3n puede ser determinando en 24 horas. Esporocistos jóvenes son reconocibles enseguida en el corazón o en el sistema hemolinfático de los caracoles vivos.

4.- Fase de desarrollo: una vez infectados, los caracoles son alimentados adecuadamente y mantenidos a una temperatura constante de 23 ± 1 °C. Las cajas son revisadas diariamente o cada dos días, para alimentar a los caracoles si es necesario y para remover los caracoles muertos. Dos semanas después de la infección las redias son reconocibles en los caracoles vivos usando microscopio de disección con luz directa. Una alimentación estándar suficiente es necesaria para producir más redias y más cercarias. Durante el tiempo mínimo de desarrollo, que son aproximadamente 30 días, se puede esperar casi del 30-40% de la mortalidad de los caracoles; se habla de tiempo mínimo de desarrollo cuando las primeras "cercarias libres" (cercarias que han abandonado la redia) son visibles a través de la concha transparente del caracol y que emergen sólo cuando son capaces de enquistarse.

5.- Fase de acumulación: durante la estivación de caracoles infectados, ocurre una acumulación de "cercarias libres" en la cavidad del cuerpo. Este fenómeno puede ser usado para completar la fase final del desarrollo de la cercaria. Caracoles con muchas redias que contienen numerosas cercarias son colocados en cajas de petri que tienen en su base papel filtro remojado en agua destilada.

Los caracoles son mantenidos a una temperatura de 23 °C,

alimentados con una mezcla estándar de alimento y cambiados a nuevas cajas cada segundo o tercer día. Durante este periodo, gran número de cercarias llegan a completar su desarrollo y abandonan la redia. Debido a que son incapaces de emerger del caracol sin sumersión, se acumulan en gran número en la cavidad del cuerpo del caracol; son visibles fácilmente al microscopio a pesar de que las cercarias están listas para su enquistamiento. Los caracoles son examinados diariamente, hasta que la mayoría de las cercarias están libres en el cuerpo.

6.- Fase de liberación: se ha observado en L. truncatula que cambios físicos súbitos, principalmente la temperatura, inducen la liberación de cercarias. Sólo si los caracoles son removidos del papel filtro cuando la mayoría de las cercarias que aparecen son libres y están dentro del agua, ocurren liberaciones masivas. Sin embargo, a los pocos días después la mayoría de los caracoles muere, junto con las cercarias que han sido incapaces de emerger. Muchas más cercarias pueden ser liberadas mecánicamente por destrucción de los caracoles cuando éstos todavía permanecen activos y se originará un mayor número de metarcercarias. Su viabilidad e infectividad es comparable con la que se ha obtenido por emisión natural. El pie del caracol es removido porque el mucus producido impide el correcto enquistamiento de algunas cercarias. Cuando se enquistan en celofán es satisfactorio, pero los

quistes no son convenientes para un largo almacenaje.

7.- **Conteo y almacenamiento de las metacercarias (Quistes):** las metacercarias enquistadas en la caja de petri son contadas bajo un microscopio de disección en una superficie de vidrio cuadriculada con un lápiz de punta de diamante. La parte inferior de las cajas de petri de plástico también puede ser cuadriculada para facilitar el conteo. No se cuentan los quistes incompletos. Después del conteo todas las metacercarias son separadas de la superficie con un pincel fino y lavadas dentro de un embudo con un papel filtro de 9 cm de diámetro. El papel filtro con las metacercarias colectadas es removido del embudo y son colocadas en frascos con tapa y almacenadas a temperatura de 4 a 6 °C.

8.- **Evaluación de la viabilidad de las metacercarias:** antes de ser usadas en un experimento, todas las metacercarias producidas por la técnica estándar son evaluadas en su viabilidad por métodos físicos y biológicos. La formación típica de gránulos excretorios es visible bajo el microscopio sólo si la metacercaria está viva. Para facilitar la observación, la capa externa de la metacercaria puede ser removida. El movimiento activo del parásito joven puede ser observado sólo si los quistes son colocados en un sitio con temperatura cercana a los 36°C. Los quistes muertos aparecen como masas difusas sin

una estructura típica y en ocasiones sólo se ve el quiste vacío. Las metacercarias también pueden ser desenquistadas por fluidos digestivos artificiales. Los cobayos y los ratones son los animales más susceptibles para evaluar la viabilidad. En las evaluaciones rutinarias, la apariencia de daño en el hígado sólo es una prueba satisfactoria de viabilidad. La evaluación en ratones es más conveniente, sólo estos animales se han usado en evaluaciones regulares. Las metacercarias son consideradas como completamente viables sólo si 18 de 20 son positivos.

9.- Administración de metacercarias a animales experimentales: las metacercarias son inyectadas en el estómago de ratones, ratas y cobayos bajo anestesia con éter y con métodos establecidos. Las metacercarias pueden ser suministradas a cobayos en pequeñas cápsulas de gelatina, o en una pieza de lechuga, pero también puede ser suministradas a conejos en cápsulas de gelatina con un tubo diseñado para estos fines; a los borregos y al ganado con un instrumento comercial, empleado para suministrar medicamentos en bolo alimenticio o en cápsulas (9) .

De hecho la viabilidad, infectividad y patogenicidad de las metacercarias obtenidas puede depender del manejo y almacenamiento después del enquistamiento (9).

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

En la literatura consultada no se encontró algún trabajo que citara de manera integrada los parámetros de la relación Fasciola hepatica-Lymnaea columella en alguna parte del mundo. Sin embargo, se pueden citar algunos datos importantes que se conocen sobre la distribución que ha seguido este caracol, así como datos investigados sobre su biología aunados a su importancia como hospedero intermediario de la fasciolosis. Lymnaea columella ó Pseudosuccinea columella es una especie americana que cubre generalmente la costa oriental de los Estados Unidos (37) (17).

De acuerdo con Hubendick (37), su rango de distribución abarca desde Manitoba y Quebec en Canada, hasta América Central y Sudamérica. Según Burch (17), su distribución abarca desde Nueva Escocia y el oeste de Quebec a Manitoba, Minnesota, Kansas, del centro al sur de Texas y Florida.

Este caracol ha colonizado Hawaii (Alicata, 1953) citado por Harris y Charleston (34) y gran parte del sur de Africa (Van Eeden y Brown, 1966) citado por Harris y Charleston (34) pero, sorprendentemente no a Europa donde está presente en invernaderos y jardines botánicos por lo menos desde 1927 (Schlesch, 1930) citado por Harris y Charleston (34). El fracaso de L. columella para establecerse en Europa parece ser debido únicamente a la discordancia del clima europeo en relación al rango de hábitats americanos descritos por Hubendick (37) y Burch (17). Esta especie fue identificada en Nueva Zelanda en 1969 aunque ha estado presente desde 1940 (70). Por otra parte Brenes et al (14),

informan de su hallazgo en Costa Rica. Además existen reportes de que ha sido localizado en Australia (68) (24).

Este caracol fué reportado por primera vez como hospedero intermediario de Fasciola hepatica por Krull (44). Este autor además infectó esta especie de caracol con los tremátodos Fascioloides magna y Paramphistomum cervi. Con base en estos datos Price (69), indica que quizá todos los caracoles que sirven como hospederos de Fascioloides magna son susceptibles también a Fasciola hepatica.

Brenes et al (14) lo mencionan como hospedero intermediario de F. hepatica en Costa Rica ya que al realizar la disección de 400 moluscos encuentran 50% de positivos a cercarias y redias del parásito, cerrando el ciclo de vida en forma experimental en conejos.

En México, la información sobre la distribución de L. columella y su papel como hospedero intermediario de Fasciola hepatica y otros tremátodos, es escasa. Hubendick (37) lo ubica en la parte central del país y en 1981 Trejo y Cruz (92) informan de su colecta en el Estado de Puebla así como su papel de hospedero intermediario de la fasciolosis en ese Estado. Posteriormente Trejo et al (93) encuentran a este caracol infectado de manera natural con el tremátodo en el Estado de Durango y con Cotylophorum spp parásito del rumen de bovinos, en el Estado de Veracruz. Finalmente Nieto et al (60), mencionan el hallazgo de L. columella en tres municipios del Estado de Morelos y su posible importancia como hospedero de la fasciolosis en ese Estado.

En Nueva Zelanda L. columella ha jugado un papel muy importante en la dispersión de E. hepatica desde su introducción identificada por primera vez por Pullan (70). L. tomentosa que es la especie nativa en Australia y Nueva Zelanda, fué el principal hospedero intermediario en las áreas endémicas conocidas en Nueva Zelanda antes de 1950, pero debido a que L. columella se haya dispersa por lo regular en los mismos hábitats de L. tomentosa, la primera especie mencionada constituye un agente potencial para favorecer la propagación; la mayoría de los informes de infección con el tremátodo en esas áreas, posteriores a 1950 son atribuibles a la colonización de L. columella (71).

Bajo condiciones de laboratorio L. tomentosa no compite exitosamente con L. columella (Harris. R. E; datos no publicados) citado por Harris y Charleston (34), de ésta manera el último puede asumir el papel de hospedero principal en las áreas "tradicionales" del parásito. A partir de estos datos de distribución en Nueva Zelanda se han descrito aspectos importantes de la biología y ecología de L. tomentosa y L. columella (34).

El largo mínimo de la concha de caracoles sexualmente maduros es de 5 mm para L. tomentosa y 9 mm para L. columella. En ambas especies para alcanzar su talla sólo se necesitan 30 días a 22°C (Harris, 1974) citado por Harris y Charleston (34), el rango de crecimiento de L. columella es grande.

Ambas especies son hermafroditas (fertilización en si mismos), aunque la fertilización cruzada puede ocurrir en L. tomentosa (11) y este hecho ha sido observado en L. columella en una ocasión, Harris y Charleston (34). La fecundidad de las dos especies es muy diferente. L. columella produce en promedio aproximadamente 3 veces más huevos (masas ovigeras) que L. tomentosa (Harris y Charleston, 1977) citados por (34). Bajo condiciones de laboratorio una proporción alta de masas ovigeras de L. columella eclosionan sin embargo, como en el campo, altos índices de mortalidad pueden dar lugar a fluctuaciones violentas en las poblaciones del caracol (Harris, 1974) citado por Harris y Charleston (34).

La temperatura máxima a la que estas especies producen masas ovigeras no ha sido determinada, sin embargo, L. tomentosa puede producir masas a 5°C y L. columella a 2°C (Harris y Charleston, 1977) citados por Harris y Charleston (34), temperaturas bajas comparadas a las que se habían reportado previamente. Las masas ovigeras se desarrollan y eclosionan en un amplio rango de temperaturas, las producidas por L. Tomentosa sobre 29°C y las de L. columella arriba de 34°C, siendo la temperatura mínima entre 8 y 10°C para ambas especies y pueden sobrevivir por más de un mes a 4°C (34).

Ambas especies habitan en charcas o estanques y pantanos (zonas fangosas), pero parecen diferir en su compatibilidad en los dos tipos de hábitats. L. columella ha sido encontrado con L. Stagnalis que frecuenta charcas y lagos, pero L. tomentosa no.

Las poblaciones de L. columella en charcas o estanques son mucho más densas y contienen caracoles grandes, comparándolas con poblaciones en hábitats adyacentes a los pantanos y esto demuestra que L. columella es primeramente un caracol de charcas o estanques que puede adaptarse a condiciones pantanosas. Con L. tomentosa sucede lo contrario (34).

Ninguna de las dos especies es tolerante a la desecación. Ambas especies pueden ser encontradas sumergidas en el agua o en la superficie. Toleran amplios rangos de concentraciones de Ca y Mg en el agua; el rango de pH que toleran varía considerablemente (34).

L. columella aparentemente prefiere la superficie del agua y un sustrato lodoso más firme que L. tomentosa. Estudios de poblaciones de L. columella han mostrado que el periodo con más bajo número de caracoles es el invierno y se da una rápida repoblación en el siguiente verano. Con su alto potencial reproductivo, las poblaciones de L. columella parecen tener más altos índices de dispersión que L. tomentosa. Las observaciones de laboratorio han mostrado que los caracoles maduros de L. columella son intolerantes a cambios medio ambientales y especímenes del campo frecuentemente mueren también después de ser transferidos al laboratorio. La ausencia de ganado infectado en la época de invierno en Nueva Zelanda es atribuible a una mortalidad alta de L. columella. Esto no es representativo de los hábitats de L. columella en áreas cálidas. Existe sin embargo, la evidencia de que el desarrollo intramolusco es más difícil en L.

Columella y que es más probable que muera esta especie en comparación con L. tomentosa cuando son infectados con E. hepatica; por lo tanto L. columella infectado, puede sucumbir a lo riguroso del invierno (34).

El número de parásitos adquiridos por el ganado en hábitats de L. columella (como sucede en Europa con L. truncatula) (64), no está relacionado a la densidad de la población de caracoles sino más bien a la proporción de caracoles maduros. El número de caracoles maduros en el hábitat es extremadamente pequeño; de 790 caracoles disectados en tres años sólo uno se encontró infectado. Esto sugiere que los pocos caracoles infectados producen un gran número de cercarias. Estudios de laboratorio apoyan esta hipótesis (Boray, 1978) citado por Harris y Charleston (34). Infectando caracoles de esta especie con un solo miracidio cada uno, Krull (1941) citado por Pantelouris (66) ha encontrado que tres meses después emergen de cada caracol de 14 a 629 metacercarias. Por otra parte, se sabe que una alta proporción de L. columella infectados experimentalmente han sucumbido a la infección, pero los sobrevivientes han producido casi el doble de cercarias que ejemplares infectados de L. tomentosa (34). Por los antecedentes mencionados se justifica la importancia que tiene el conocer a L. columella, existente en México, en su relación con E. hepatica y de esta forma tratar de dilucidar su posible papel como transmisor de esta parasitosis, con relación a otras especies de hospederos intermediarios de la fasciolosis existentes en la República Mexicana.

OBJETIVOS

- a) Evaluar la susceptibilidad a la infección con miracidios de Fasciola hepática, de caracoles Lymnaea columella provenientes de dos localidades, Acambay-Edo. de Méx. y Huauchinango-Puebla.
- b) Evaluar la infectividad de las metacercarias obtenidas en las infecciones de Lymnaea columella de las dos poblaciones, utilizando dos técnicas diferentes: in vivo suministrándolas a conejos e in vitro por desenquistamiento mecánico.

MATERIAL Y METODO

- a) Colecta de caracoles y su adaptación al laboratorio: los caracoles utilizados en el presente trabajo fueron colectados en los municipios de Huauchinango-Puebla y Acambay-México; se trasladaron en bolsas de plástico con agua del hábitat natural del caracol, al laboratorio del PROYECTO FASCIOLASIS DEL INIFAP en Palo Alto, D.F. Ya en el laboratorio, los caracoles fueron colocados en medios de cultivo especiales para su mantenimiento, los cuales se elaboraron de la siguiente manera: en una caja de petri de plástico se colocó una capa lodosa (lodo colectado en el campo, remojado y cernido en un tamiz) de 5 mm de grosor dejando secar un poco para inmediatamente añadirle una capa de aproximadamente el mismo grosor de alga

Oscillatoria sp (también colectada en el campo) previamente molida con agua; el cultivo se deja secar unos minutos, se tapa y se traslada a cuartos especialmente acondicionados con iluminación constante y una temperatura de 20-25 °C para de esta manera estimular el crecimiento del alga en la capa lodosa durante aproximadamente 48 horas; después de este periodo de tiempo, los medios de cultivo estaban disponibles para utilizarse, manteniendo su humedad agregándoles sólo agua de la llave. Los caracoles de campo permanecieron así, en sus cultivos, realizándose el cambio de éstos cada tercer día, hasta alcanzar su madurez en la que se inicia el periodo de oviposición. Las masas ovigeras fueron recolectadas de los medios de cultivo de cada una de las dos poblaciones de caracoles y colocados por separado en cajas de petri de cristal, agregándoles agua de llave y trasladándolas finalmente a los mismos cuartos donde se mantenían los medios de cultivo, ya que sólo de ésta manera podían tener una temperatura más o menos constante para su eclosión lo cual sucedió alrededor del día 15 después de la oviposición. De esta manera se obtuvieron aproximadamente de 5 a 6 generaciones de caracoles, que procedían de cepas obtenidas en el campo.

- b) Obtención de progenitores (F₁): las últimas masas ovigeras obtenidas de ambas poblaciones, en las generaciones arriba mencionadas, fueron utilizadas para dar origen a los

caracoles progenitores (F_1). Los caracoles que se originaron de estas masas ovigeras fueron mantenidos bajo las circunstancias ya descritas, hasta su madurez (oviposición) que inició alrededor de los 28 días de edad. Las masas ovigeras colectadas se mantuvieron de la misma manera que las generaciones precedentes con la única diferencia que se llevó un control, lo más exacto posible, del día de la oviposición y el día de la eclosión de las masas ovigeras obtenidas con la finalidad de que entre ellas existiera la mínima diferencia en días ya que de ahí se obtendría la siguiente generación; todo esto para las dos poblaciones.

- c) Obtención de lotes experimentales y testigos (F_2): las masas ovigeras de la F_1 , de ambas poblaciones, obtenidas en las últimas oviposiciones, fueron los que se utilizaron para dar origen a los caracoles experimentales y testigos (F_2). Para ello se consideró lo siguiente: las últimas oviposiciones fueron las más numerosas y además lo importante fué que la diferencia en días entre ellas era mínima (2-3 días) de tal manera que se pudo tener la certeza de que los caracoles (F_2) que se originaron de estas masas ovigeras, iban a tener entre ellas la mínima diferencia de edad.

- d) Mantenimiento de (F₂) hasta la infección: una vez obtenida la F se procedió a la colocación por separado de lotes experimentales y testigos de ambas poblaciones. En un principio se colocaron 15 lotes con 20 caracoles cada uno; pero el número de caracoles por cultivo se fué disminuyendo a cada semana de desarrollo, para que la densidad de población no representara un factor de competencia por el alimento. Los cultivos fueron mantenidos en la forma ya descrita de tal manera que para el día de la infección se tenían 20 lotes experimentales con 5 caracoles cada uno y 10 lotes testigos también con 5 caracoles por lote, para las dos poblaciones.
- e) Infección de lotes experimentales: para realizar la infección se colectaron vesículas biliares de bovinos fasciolosos sacrificados en el rastro de Tulancingo-Hgo.; las vesículas fueron trasladadas al laboratorio en bolsas de plástico; los huevos de Fasciola hepatica fueron obtenidos de la bilis mediante diversos lavados y decantaciones, siendo colocados posteriormente en cajas de petri cubiertos con cinta adhesiva e incubados a una temperatura de 20 a 22°C por aproximadamente 30 días hasta su utilización. Cuando los caracoles de ambas poblaciones alcanzaron su tercera semana de edad (en la segunda estaban muy poco desarrollados), los huevecillos incubados de Fasciola hepatica se expusieron a la luz bajo un foco de 100 watts colocado a unos 20 cm de altura;

los miracidios eclosionaron unos minutos después de la exposición.

La infección de los caracoles se realizó en forma masiva; se colocaron por separado los 100 caracoles a infectar de cada población en cristalizadores con aproximadamente 1000 ml de agua destilada. Seguidamente a cada cristalizador se le fueron añadiendo, con la ayuda de una pipeta Pasteur, pequeñas alícuotas del agua que contenía los miracidios; bajo el microscopio estereoscópico se realizó el conteo del número aproximado de miracidios que contenía cada alícuota, de tal manera, que finalmente se añadió a cada cristalizador un promedio de 4 miracidios por caracol; los caracoles estuvieron expuestos a la penetración (infección) de miracidios durante 4 horas. Con los 50 caracoles testigos de cada población se procedió de la misma forma sólo que sin adicionar los miracidios. Una vez transcurrido el tiempo de infección, los moluscos fueron regresados a sus respectivos medios de cultivo, cambiándolos cada tercer día y manteniéndolos así hasta llegar a su etapa de liberadores de cercarias. Cuando se efectuaba el cambio de los cultivos, se revisaba si existían en ellos caracoles muertos los cuales se separaban para inmediatamente realizarles la disección correspondiente con el fin de buscar formas larvarias del parásito. Para esto, las partes blandas se retiraban de la concha y los tejidos se desgarraban con agujas de

disección observando primeramente bajo el microscopio estereoscópico; si no se observaban estadios larvarios del parásito, los tejidos se colocaban entre portaobjetos y cubreobjetos (presionando homogéneamente) y observándolos al microscopio compuesto; además se llevó un registro de los caracoles que si presentaban formas larvarias del parásito. La disección se realizó tanto a los caracoles que morían en el periodo prepatente (comprendido entre el día de la infección y el día en que se obtuvo la primera liberación) como a los moluscos que morían en el transcurso del tiempo en que se obtuvieron todas las liberaciones, e incluso, a los caracoles que permanecieron vivos hasta el final y que nunca liberaron.

- f) Obtención y almacenamiento de metacercarias: en un periodo de 40 días después de la infección, las fases larvarias de E. hepatica evolucionaron a cercarias dentro del caracol, fué entonces el momento de colocar a los moluscos en condiciones óptimas para la producción de metacercarias. Los caracoles de los lotes experimentales se colocaron de manera individual en bolsitas de plástico con capacidad en volumen de 80 ml, con 40 ml de agua de la llave, sometiéndolos inmediatamente a cambios bruscos de temperatura, colocándolos en refrigeración de 5 a 10 min. y enseguida bajo un foco de 100 watts a un metro de distancia durante 24 horas; todo esto con el fin de inducir la liberación. Cada bolsita se marcó con un

número, con el propósito de conocer los caracoles que liberaban y asignarles las metacercarias encontradas en su bolsa correspondiente; con los caracoles testigos de cada población se procedió de la misma forma con la única diferencia que fueron colocados en bolsitas de plástico por lotes. Los moluscos fueron expuestos, bajo estas condiciones, una vez por semana durante 28 días de tal manera que se obtuvieron en total 4 liberaciones semanales. Las metacercarias obtenidas en las 4 exposiciones se dejaron 48 horas a temperatura ambiente, e inmediatamente después se realizó el conteo sobre una caja de petri cuadrículada en el fondo, con la ayuda de un contador manual y se guardaron con el mismo plástico donde se enquistaron, en tubos de ensayo añadiéndoles agua de la llave hasta el tope de su capacidad y sellándolos. Los tubos fueron almacenados en el refrigerador a una temperatura de 4 °C para su posterior utilización. Como ya se mencionó líneas arriba, se llevó un registro del número de metacercarias liberadas por cada caracol, ya sea en cada exposición o incluso en su medio de cultivo; al mismo tiempo se llevó un registro global de las metacercarias obtenidas en cada liberación para ambas poblaciones.

- g) Evaluación in vitro de la viabilidad de las metacercarias (desenquistamiento mecánico): se realizó a los 10 días de obtenida la última liberación. Para ello se seleccionaron al azar 20 metacercarias de cada una de las liberaciones

obtenidas en las dos poblaciones. Estas metacercarias se colocaron 1 x 1 en un portaobjetos y observando en el microscopio compuesto, se procedió a "pinchar" el quiste con una aguja de disección, de tal manera que se liberara una mínima de parte de la cubierta del mismo. En ese momento se pudo observar en cada uno de los quistes, si el parásito estaba vivo presentaba cierta motilidad, en caso contrario, sólo se apreciaba una masa difusa dentro del quiste. Todos estos datos se fueron registrando.

- h) Evaluación "in vivo" de la viabilidad de las metacercarias (infección de animales experimentales): para determinar la infectividad de las metacercarias obtenidas, se infectaron conejos que ya se encontraban adaptados a un lugar especial para su cuidado por lo menos 25 días antes de su infección. Para infectarlos se procedió de la siguiente manera: se elaboraron cápsulas de gelatina añadiéndole a cada una 20 metacercarias elegidas al azar entre todas las disponibles de cada una de las liberaciones de ambas poblaciones; también se elaboraron cápsulas conteniendo una combinación de metacercarias (también 20 en total) de las 4 liberaciones tanto del Estado de Puebla como del Estado de México. Esto con el propósito de tener un margen más amplio de análisis en la evaluación de la infectividad. Por otra parte, se formaron 6 lotes con 5 conejos cada uno, para cada población; cuatro lotes fueron infectados con metacercarias de cada una de las

liberaciones obtenidas, uno con la combinación y el lote restante fué el testigo. Se le administró una cápsula por vía oral a cada conejo ayudándose para ello con unas pinzas y dándole agua con una pipeta para tener la certeza de que el animal no la desechara. Ya infectados los conejos fueron mantenidos por un lapso de 8 semanas, tiempo necesario para el desarrollo de Fasciola hepática en su hospedero definitivo; transcurrido este periodo de tiempo se procedió a su sacrificio aproximadamente 10 días después de finalizado su periodo prepatente (con duración de 46 días en conejos). La evaluación de la infectividad se realizó con base al número de fasciolas adultas que pudieron ser recuperadas en los hígados de los conejos sacrificados.

El análisis estadístico de todos los resultados obtenidos se realizó por medio de estudios de análisis de varianza (ANOVA) trabajando a un 99% de confianza o en su defecto con una prueba (t) de Student con el mismo porcentaje de confianza. Cuando se encontraron diferencias significativas, también se realizó una prueba de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los parámetros evaluados en el presente trabajo fueron: infección de los caracoles, producción de metacercarias, mortalidad de los caracoles y viabilidad de las metacercarias con el propósito de determinar la susceptibilidad de los caracoles a la infección y la infectividad de las metacercarias obtenidas de ambas poblaciones.

Los resultados que se obtuvieron son los siguientes: en la positividad de los caracoles a la infección con miracidios de Easciola hepatica no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.01$; $P > 0.05$) entre ambas poblaciones de acuerdo con la prueba (t) de Student realizada, (cuadro 1).

Los datos de la producción de metacercarias obtenidas por localidad en las cuatro exposiciones se muestran en el cuadro (2). De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) realizado con estos datos se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) por localidad, liberación y en la interacción localidad X liberación siendo 23.25, 5.2, 5.12 sus valores respectivos, (cuadro 3).

En el cuadro (4) se muestran los datos del número de caracoles liberadores y el total de metacercarias que se obtuvo en cada una de la exposiciones de ambas poblaciones. También se registró el número de metacercarias liberadas por cada caracol en las cuatro exposiciones de ambas localidades como se ilustra en el cuadro (5). Analizando estos datos mediante la prueba (t) de Student se encontró una diferencia significativa ($P < 0.01$) entre ambas

poblaciones.

El cuadro (6) muestra en forma comparativa y resumida los datos del número de caracoles expuestos a la infección, número de caracoles infectados, número de caracoles liberadores y número de metacercarias obtenidas para ambas poblaciones.

Los datos de la mortalidad por semana observada en los caracoles experimentales y testigos de ambas poblaciones, desde la infección hasta la cuarta exposición, se muestran en el cuadro (7). Según el estudio de análisis de varianza (ANOVA) cuadro (8) realizado con los datos de mortalidad no se observaron diferencias significativas ($P > 0.01$; $P > 0.05$) por localidad, pero si existió una diferencia significativa ($P < 0.01$) por semana y en la interacción localidad X semana.

El número de fasciolas adultas recuperadas, (viabilidad in vivo), en los animales experimentales de ambas localidades se muestra en el cuadro (10). Realizando un análisis de varianza (ANOVA) con estos datos, no se observó diferencia significativa ($P > 0.01$; $P > 0.05$) por localidad y en la interacción localidad X liberación, existiendo sólo diferencia significativa ($P < 0.01$) por liberación (ver cuadro 11).

Los resultados obtenidos al evaluar la viabilidad in vitro de las metacercarias producidas en las cuatro exposiciones de ambas poblaciones, se ilustran en el cuadro (13).

La susceptibilidad de un hospedero intermediario de la fasciolosis como es el caso de Lymnaea columella puede estar determinada por varios parámetros como son: su positividad a la

infección con miracidios de E. hepatica, su producción de metacercarias relacionada con el número de caracoles de una población determinada que puedan ser productores de metacercarias y además su comportamiento poblacional en el periodo de infección.

Con base en los resultados obtenidos, existe una positividad a la infección que no muestra diferencias significativas ($P > 0.01$; $P > 0.05$) entre ambas poblaciones. Se obtuvo un 58% de infección para caracoles del Edo. de México, y un 68% para caracoles del Edo. de Puebla. Lo anterior se podía esperar si se considera que se trabajó con una misma especie. Sin embargo, esta misma especie, infectando dos poblaciones diferentes, muestra diferencias significativas ($P < 0.01$) muy importantes en lo que se refiere a la producción de metacercarias.

En efecto, trabajando con los caracoles de ambas localidades en las mismas condiciones, se advierte que L. columella del Edo. de México presenta una menor producción de metacercarias en total y en cada una de las exposiciones en relación a L. columella del Edo. de Puebla, Ver cuadro (2). Así se tiene que considerando el total de metacercarias producidas por ambas poblaciones en cada una de las exposiciones, la 1a. y la 4a. resultaron ser las mejores y al mismo tiempo la 2a. y la 3a. sólo pueden ser comparadas estadísticamente con la 4a. Interpretando las diferencias en la interacción localidad X liberación que nos muestra el análisis de varianza en relación a la producción de metacercarias tenemos que la 1a. liberación del Edo. de Puebla

fué la mejor, seguida en orden decreciente por la 4a., 3a., y 2a. también del Edo. de Puebla. Además, todas las liberaciones del Edo. de México fueron estadísticamente iguales entre sí, pudiéndose comparar sólo con la 3a. y la 2a. del Edo. de Puebla.

Esta diferencia en la producción de metacercarias tiene una base muy importante en el número de caracoles, del total de la población infectada, que pudo resultar liberador de cercarias. En este renglón también se advierte una diferencia muy marcada favorable a L. columella de Puebla ya que mientras en esta población se obtuvieron 37 caracoles liberadores, en L. columella de México sólo se obtuvieron 17 de un total muy similar, en números, de caracoles que si lograron infectarse.

Cabe mencionar, como se muestra en el cuadro (4), que el número de caracoles que resultaron liberadores iba decreciendo en las exposiciones subsecuentes, no así el número de metacercarias que se obtenía de estos caracoles, presentándose fluctuaciones muy importantes.

El número de metacercarias producidas por caracol liberador también es importante en este análisis de la susceptibilidad. Así tenemos que mientras los caracoles del Edo. de México liberaron en un rango de 1-174 metacercarias cada uno, los moluscos del Edo. de Puebla liberaron en un rango de 12-625 por caracol; este último dato es similar al que encontró Krull, 1941 citado por Pantelouris (66), al infectar a Lymnaea columella de manera individual con un miracidio cada caracol.

Una posible explicación a estas diferencias tan marcadas podría estar basada en el hecho de que se observó una discrepancia, en el tiempo que requerían para crecer o desarrollarse algunos caracoles: hubo varios moluscos de la población del Edo. de Puebla que alcanzaban tamaños algo considerables en corto tiempo en comparación de un cierto número de caracoles de la población del Edo. de México que sí alcanzaban a desarrollar un buen tamaño pero requerían de un lapso más largo de tiempo.

Si se considera esta alternativa se podría pensar que la población del Edo. de Puebla tuvo una mayor producción de metacercarias desde la 1a. exposición debido a que hubo un cierto número de caracoles de esta localidad que crecieron y maduraron en un lapso corto de tiempo y probablemente en ellos se pudieron desarrollar un mayor número de parásitos. Se puede suponer también que estas diferencias en el tiempo de desarrollo entre los caracoles de ambas localidades están asociadas inevitablemente a una diferencia muy marcada en la competencia por el alimento entre los caracoles de cada lote en el transcurso de su mantenimiento. De ésta forma se estaría de acuerdo con los conceptos de Kendall (42) en el sentido de que el número de cercarias que maduran dentro del molusco está relacionado a la cantidad de alimento disponible para las redivias a través de los tejidos del caracol: entre más desarrollado esté el molusco hay mucho más probabilidades de desarrollo de un gran número de parásitos.

Esta variación en la susceptibilidad no se puede discutir de acuerdo al criterio de Kendall (42) que sugiere al presencia de razas o razgos fisiológicos en E. hepatica de tal forma que estos determinan el índice de susceptibilidad de algunos hospederos intermediarios. Para eliminar esta posibilidad se trabajò con una cepa de E. hepatica proveniente de un lugar neutro en relación a las localidades de donde provenían los caracoles utilizados.

De los datos obtenidos se observa que ambas poblaciones presentan un índice de mortalidad muy similar que sólo varia de una semana a otra entre las dos localidades (cuadro 7). Considerando las diferencias en la mortalidad por semana que muestra el ANOVA, se tiene que es en la 7a. semana cuando existe un mayor número de caracoles muertos, tanto en lotes experimentales como testigos, y es en la 2a. semana donde se registra la menor mortalidad. Además, las diferencias en la mortalidad registradas en la interacción localidad X semana, indican, que por lo regular, cuando morían más de 13 caracoles de una misma localidad, ya sea de los lotes experimentales o de los testigos en una sola semana, la mortalidad ya era considerable, disminuyendo su significado conforme decrecia el número de caracoles muertos por semana. Ver cuadro (7).

La mortalidad de los caracoles experimentales de ambas localidades se registrò por semanas porque sólo de ésta manera se podía analizar más detalladamente el comportamiento de los moluscos en el periodo de infección cuadro (9). De esta manera, se puede considerar que en la primera semana postinfección se da una mortalidad algo significativa que pudo ser debida

principalmente a la tensión a que se sometieron los caracoles al infectarlos ya que no se encontraron estadios larvarios del trematodo; la misma tensión causada por la infección es notoria aún por la tercera semana, principalmente en los caracoles del Edo. de Puebla donde se registra una alta mortalidad pero aún sin encontrarse formas larvarias de E. hepatica. Alrededor de la 4a. semana de infección se conjuntan tanto la tensión como la posible migración del parásito dentro del caracol ya que se empiezan a encontrar positivos algunos de los limneidos muertos. Ya de la 5a. semana en adelante es principalmente la infección, en concreto la migración del parásito (51), la que mata a los caracoles, ya que la mayoría resultan positivos a la infección y las formas larvarias encontradas van siendo cada semana más desarrolladas; se puede suponer lo anterior ya que como se ha mencionado, son los estadios finales de desarrollo del parásito y particularmente la emisión de cercarias, los que causan el mayor daño a los caracoles (42). Este fenómeno según lo observado, se continúa hasta la décima semana en que finalizó el experimento, si se considera el dato citado por Kendall (42) en el sentido de que no todos los parásitos se desarrollan y maduran igualmente y al mismo tiempo dentro del caracol, además de que en las últimas cuatro semanas (las de las exposiciones) se comprueba que la liberación de cercarias del parásito tampoco se da como un proceso continuo (42) ya que hubo una gran fluctuación en cuanto a la cantidad de cercarias liberadas por caracol. Ver cuadro (4). Se observa, por ejemplo, que en la 2a. exposición se obtiene un

menor número de metacercarias para las dos poblaciones. Esto pudo haberse debido a que en esta semana (8a.) de la infección no hubiesen estado lo suficientemente maduras las redivias encontradas como para que emergieran las cercarias ya que en la semana anterior a ésta y en las siguientes el número de cercarias emitidas por ambas poblaciones no disminuye notoriamente cuadros (2) y (4).

Todo este comportamiento poblacional de los caracoles experimentales está plenamente apoyado por el que presentan los caracoles testigos de ambas poblaciones (grafica 1) en donde se advierte que la mortalidad más importante en los lotes testigos es debida a la tensión a que se sometieron los moluscos y se registra por lo regular en las últimas cinco semanas del experimento, llegando a ser incluso muy drástica en la población del Edo. de Puebla pero, lo más importante, sin seguir un patrón similar al de los lotes experimentales.

Integrando la discusión de todos estos parámetros, se observa que si los caracoles de ambas poblaciones se infectan de una manera similar, también es cierto que su capacidad para producir metacercarias de E. hepática es muy diferente y esto se ve subrayado en el número de caracoles liberadores de cada población, el número de cercarias que producen cada uno y el total de metacercarias producidas en las 4 exposiciones. Además, lo importante de analizar el comportamiento en la mortalidad de los caracoles experimentales de ambas poblaciones fue que, a pesar de mostrar una respuestas muy similar a la presencia del

trematodo en todo el periodo de infecci3n, el desarrollo del par3sito varia considerablemente entre los caracoles de ambas localidades y consecuentemente su susceptibilidad a F. hepatica. Por todo lo anterior se puede decir que si se observ3 una diferencia importante en la susceptibilidad de L. columella a ser infectado con miracidios de F. hepatica, que result3 favorable a la poblaci3n del Edo. de Puebla con relaci3n a la poblaci3n del Edo. de M3xico.

Para determinar la infectividad de las metacercarias producidas por ambas poblaciones se consider3 el n3mero de fasciolas adultas recuperadas en los h3gados de los conejos infectados (viabilidad in vivo) y el porciento de viabilidad in vitro que se obtuvo al desenquistarlas mec3nicamente.

De acuerdo con el ANOVA realizado con los datos de las fasciolas adultas recuperadas, no existi3 diferencia significativa ($P > 0.01$; $P > 0.05$) entre ambas localidades ni tampoco en la interacci3n localidad X liberaci3n; esto significa que se pudieron haber obtenido cantidades semejantes de fasciolas adultas en ambas localidades, pero una diferencia muy importante la constituye el hecho de que 3 conejos infectados con metacercarias del Edo. de M3xico, murieron antes del sacrificio y no se consideraron en el recuento final. La 3nica diferencia se encontr3 por liberaci3n y es as3 como revisando los datos se ve que se recuper3 un mayor n3mero de fasciolas adultas de las metacercarias obtenidas de la 1a. liberaci3n seguida por la 4a., la combinaci3n y la 3a. liberaci3n, siendo de la 2a. en donde no se recuper3 ning3n par3sito adulto. Lo anterior significa que las metacercarias m3s

infectivas provenían de la 1a. y la 4a. liberación de ambas localidades y las menos infectivas de la 2a. liberación.

Un análisis complementario de estos datos puede hacerse siguiendo el criterio de Anaya et al (4), cuadro (2); vemos que considerando el número de fasciolas adultas recuperadas en los conejos experimentales en relación al número de metacercarias administradas, lo que se conoce como índice de recuperación, si éste se analiza en forma global o sea por localidad es mayor para los conejos infectados con las metacercarias que provenían de La Colomella del Edo. de Puebla (0.51), por lo que se puede suponer una diferencia en la infectividad de las metacercarias de ambas poblaciones, favorable al Edo. de Puebla. Sin embargo, cabe mencionar que bajo este criterio puede no considerarse una edad controlada de las metacercarias administradas a un mamífero experimental como lo muestra el trabajo de Anaya et al (4). Pero si se analiza el índice de recuperación por liberación se ve que indudablemente todos los datos coinciden con lo anteriormente mencionado de acuerdo al análisis de varianza y que una diferencia real sólo se pudo observar tomando en cuenta la liberación de donde provenían las metacercarias, entendiéndose por esto, la edad aproximada de los quistes; cuadros (10) y (11). Esto último fué importante en el presente estudio porque se pretendió tener un conocimiento de la viabilidad in vivo pero con base en la edad de los quistes para de esta forma tratar de relacionarla a la infectividad que presentan en sus hospederos definitivos, en este caso, conejos.

Por otra parte el porcentaje de viabilidad in vitro que se obtuvo muestra que las metacercarias de la 4a. y 3a. liberación seguidas de la 1a. de ambas localidades, resultaron ser las más viables y las menos, fueron las metacercarias obtenidas en la 2a. liberación.

Todo lo analizado respecto a la viabilidad in vivo e in vitro coincide con los datos de que fué en la 1a. y la 4a. liberación, seguidas de la 3a. en donde se obtuvo un número mayor de metacercarias para ambas poblaciones, registrándose la producción menor en la 2a. liberación. Por otro lado, este hecho, permite inferir que definitivamente el desarrollo del parásito dentro del caracol L. columella si se altera de alguna forma bajo las condiciones de trabajo, cuando se induce a los moluscos a liberar el tremátodo, ya que como se mencionó anteriormente, no todos los parásitos que están alojados dentro de un caracol maduran a un mismo tiempo y muy probablemente al inducir su emisión hacia el exterior, no todos estén completamente desarrollados o maduros como para ser infectivos a sus hospederos definitivos. Así, se puede pensar que en realidad la infectividad de las metacercarias obtenidas de los caracoles Lymnaea columella de ambas poblaciones, sólo difiere dependiendo de la liberación de donde hayan sido obtenidas, es decir, de los días que tengan de enquistadas. Este dato no coincide con el citado por Boray (15) probablemente porque ninguno de esos reportes compara la viabilidad de las metacercarias producidas por dos poblaciones de una misma especie de hospedero intermediario como el caso de L.

Columella: todo esto aunado a la importancia que pudiese llegar a tener el hecho de inducir experimentalmente a los caracoles a liberar cercarias.

La diferencia en susceptibilidad a la infección con miracidios de E. hepatica y la relativa semejanza en la infectividad de las metacercarias de ambas poblaciones obtenidas en este trabajo, son difícil de extrapolar por ahora, a las condiciones de la naturaleza. Para ello, se requieren todavía numerosos estudios en los cuales se puedan investigar diversos aspectos sobre la biología de L. columella y su interacción con los factores bióticos y abióticos que determinan su existencia en algunas zonas de la República Mexicana. Sin embargo, si se puede sugerir con base en lo estudiado, que existe una cierta discrepancia entre las dos poblaciones, a nivel experimental, como hospederos intermedios de la fasciolosis. De acuerdo a los datos presentados en este trabajo y a los reportados por Anaya *et al* (4) quienes encontraron que las metacercarias producidas por L. columella han resultado ser las más infectivas al compararlas con las que producen otras 3 especies de hospederos intermedios, también existentes en México, se considera que el caracol L. columella debiera ser tomado con mayor interés como transmisor de la fasciolosis en México.

Por lo anterior, se debe pensar en la necesidad de estudiar más a fondo a L. columella como transmisor de esta parasitosis ya que como lo muestran los reportes de Nájera (59), Nieto *et al* (60),

Trejo y Cruz (92) y Trejo et al (93) ésta especie existe en varias zonas de algunos estados de la República Mexicana.

Lo realizado en el presente trabajo sólo constituye una pequeña aportación al conocimiento de la biología de L. columella existente en México y por lo tanto se pueden sugerir algunas modificaciones al mismo, y de esta forma se daría lugar a confirmar o refutar lo encontrado aquí y a investigar otros aspectos relevantes en la relación E. hepatica-L. columella como parte importante de la fasciolosis en la República Mexicana.

Algo de lo que se podría sugerir de acuerdo con lo realizado en el presente estudio sería:

El mantener a todos los caracoles de manera individual con una dieta estándar desde el inicio del experimento; de esta forma se podría apreciar si en realidad existen diferencias en el tiempo que requieren para madurar o desarrollarse los limneidos de ambas poblaciones; si no se da de esta forma la diferencia encontrada aquí, se tendría la posibilidad de infectar a los moluscos a las dos semanas de edad que sugiere Sánchez (80), como la mejor para realizar infecciones experimentales, ya que muy probablemente los caracoles en éstas condiciones alcanzarían un mayor desarrollo al obtenido aquí en dos semanas y quizás su respuesta a la infección sería algo diferente.

Trabajar por lo menos dos cepas diferentes de E. hepatica para cada una de las dos poblaciones de L. columella estudiadas, tratando de analizar si en verdad existen esas

diferencias tan marcadas encontradas aquí entre las dos localidades y poder ir definiendo la importancia que podría tener cada una en el contexto de la fasciolosis en México.

Finalmente sería importante contemplar la posibilidad de trabajar infecciones experimentales de E. columella proveniente de todas las localidades en donde se ha encontrado, comparándola con otras especies de hospederos intermedios también existentes en la República Mexicana para evaluar todos los parámetros posibles en la relación parásito-hospedero intermedio y de esta manera ir definiendo la importancia real de cada especie en la transmisión de E. hepatica; esto sería más interesante si se realiza con hospederos intermedios de diferentes especies que se pudiesen encontrar en un mismo hábitat donde también se localice a E. Columella. Se comprobaría por ejemplo, si realmente es importante el índice de producción de metacercarias por caracol alcanzado por la población del Estado de Puebla.

CUADRO 1

REGISTRO DE CARACOLES QUE RESULTARON POSITIVOS A LA INFECCION CON
MIRACIDIOS DE *E. hepatica*

No. DE LOTE	<i>Lymnaea columella</i>	<i>Lymnaea columella</i>
	EDD. DE MEXICO	EDD. DE PUEBIA
1	4	4
2	3	2
3	2	5
4	1	5
5	3	4
6	5	4
7	2	3
8	3	3
9	3	1
10	4	2
11	4	4
12	4	4
13	5	3
14	5	4
15	4	5
16	3	4
17	1	2
18	4	3
19	2	5
20	3	2
TOTAL	58	68

PRUEBA (t) DE STUDENT

$$t = 1.28 **$$

(**) NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0.01; P>0.05)

CUADRO 2

PRODUCCION DE METACERCARIAS DE E. hepatica OBTENIDAS POR LOCALIDAD EN CADA UNA DE LAS EXPOSICIONES.

	1a. lib.	2a. lib.	3a. lib.	4a. lib.	total
<u>Lymnaea columella</u> EDO. DE MEXICO	249	214	276	281	1020
<u>Lymnaea columella</u> EDO. DE PUEBLA	3174	505	967	1339	5985

CUADRO 3

ANALISIS DE VARIANZA DE LA PRODUCCION DE METACERCARIAS DE Fasciola hepatica OBTENIDAS POR LOCALIDAD EN CADA UNA DE LAS EXPOSICIONES.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS D'LIBERT	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F
LOCALIDAD	1	154070.15	154070.15	23.25 *
LIBERACION	3	103395.82	34465.273	5.2 *
LOCALIDAD x LIBERACION	3	101858.62	33952.873	5.1236*
ERROR	152	1007264.7	6626.7414	
TOTAL	159	1366589.3		

(*) HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P<0.01)

CUADRO 4

DATOS SOBRE EL NUMERO DE CAPACOCLES LIBERADORES Y SU PRODUCCION DE MFTACERCARIAS DE *E. hepatica* EN CADA UNA DE LAS EXPOSICIONES DE AMBAS POBLACIONES

	1a. lib.	2a. lib.	3a. lib.	4a. lib.
MFT. PROD.	249	214	276	281
<i>LYMNAEA</i> <i>COLUMELLA</i> EDD. DE MEXICO				
	$\bar{x}=19.15$	$\bar{x}=26.75$	$\bar{x}=55.2$	$\bar{x}=70.25$
CAR. LIB.	13	8	5	4
MFT. PROD.	3174	505	967	1339
<i>LYMNAEA</i> <i>COLUMELLA</i> EDD. DE PUERTO				
	$\bar{x}=96.19$	$\bar{x}=29.70$	$\bar{x}=69.1$	$\bar{x}=167.3$
CAR. LIB.	33	17	14	8

CUADRO 5

NUMERO TOTAL DE METACERCARIAS DE E. hepatica LIBERADAS POR CADA CARACOL EN LAS CUATRO EXPOSICIONES DE AMBAS POBLACIONES

E. columella
(EDO. DE MEXICO)

E. columella
(EDO. DE PUEBLA)

CLAVE DEL CARACOL	TOTAL DE MET. LIB.	CLAVE DEL CARACOL	TOTAL DE MET. LIB.
1.1	133	3.1	143
1.2	8	3.2	206
2.1	12	3.3	194
2.3	26	3.4	36
5.1	1	4.1	200
5.2	36	4.2	88
5.4	149	4.3	360
6.1	34	4.4	182
6.2	35	7.1	157
12.2	112	8.1	194
12.3	21	9.1	189
13.1	60	10.1	625
13.2	97	10.2	14
13.3	27	11.2	111
15.1	174	11.4	103
18.2	61	11.5	65
18.3	34	12.1	97
		12.2	173
		12.3	360
		12.4	12
		13.1	148
		13.2	242
		13.4	25
		14.1	60
		15.1	57
		15.2	231
		16.1	468
		16.2	81
		16.4	40
		16.5	21
		17.1	60
		18.1	50
		18.3	222
		19.1	122
		19.3	32
		20.2	174
		20.3	454

PRUEBA (*) DE STUDENT DEL TOTAL DE METACERCARIAS LIBERADAS POR CARACOL EN LAS CUATRO EXPOSICIONES DE AMBAS POBLACIONES.

t=3.70 *

(*) HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P<0.01)

CUADRO 6

CUADRO COMPARATIVO CON LOS DATOS DEL NUMERO DE CARACOLES EXPUUESTOS A LA INFECCION, NUMERO DE CARACOLES INFECTADOS, NUMERO DE CARACOLES LIBERADORES Y NUMERO DE METACERCARIAS OBTENIDAS EN TODAS LAS EXPOSICIONES DE AMBAS POBLACIONES.

	NUM. DE CAR. EXP. A LA INFECC.	NUMERO DE CARACOLES INFECTADOS Y SU (%)	NUM. DE CARACOLES LIB. Y SU (%)	TOTAL DE METACER- CARIAS OBTENIDAS	METACER- CARIAS POR CARACOL LIBERADOR
<i>Lymanaea</i> <i>columella</i> FDQ. DE MEXICO	100	58 58%	17 29.3%	1020	60
<i>Lymanaea</i> <i>columella</i> FDQ. DE PUEBLA	100	68 68%	37 54.4%	5985	161.7

CUADRO 7

DATOS DE MORTALIDAD POR SEMANAS DE CARACOLES EXPERIMENTALES Y TESTIGOS EN AMBAS POBLACIONES DESDE LA INFECCION HASTA LA CUARTA EXPOSICION.

SEMANAS	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	8a.	9a.	10a.	TOTAL
L. columna lla EDD. DE MEXICO (EXPER.)	12	4	14	9	18	13	13	6	4	0	93
L. columna lla EDD. DE PUEBLA (EXPER.)	14	5	2	2	6	20	19	8	13	1	90
L. columna lla EDD. DE MEXICO (TESTIGO)	0	1	0	4	0	6	4	3	0	16	36
L. columna lla EDD. DE PUEBLA (TESTIGO)	0	1	0	10	1	0	13	15	6	4	50

CUADRO 8

ANALISIS DE VARIANZA DE LA MORTALIDAD POR SEMANA EN CARACOLIS EXPERIMENTALES Y TESTIGOS DE AMBAS PORLACIONES, DESDE LA INFECCION HASTA LA CUARTA EXPOSICION.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS D'LIBERT	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F
LOCALIDAD	1	1.63333	1.63333	2.23 **
SEMANA	9	20.706663	2.3007403	3.14 *
LOCALIDAD x SEMANA	9	60.533337	6.7259263	9.18 *
ERROR	581	425.8	0.7328743	
TOTAL	599	508.67333		

(*) HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P < 0.01$)

(**) NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P > 0.01$; $P > 0.05$)

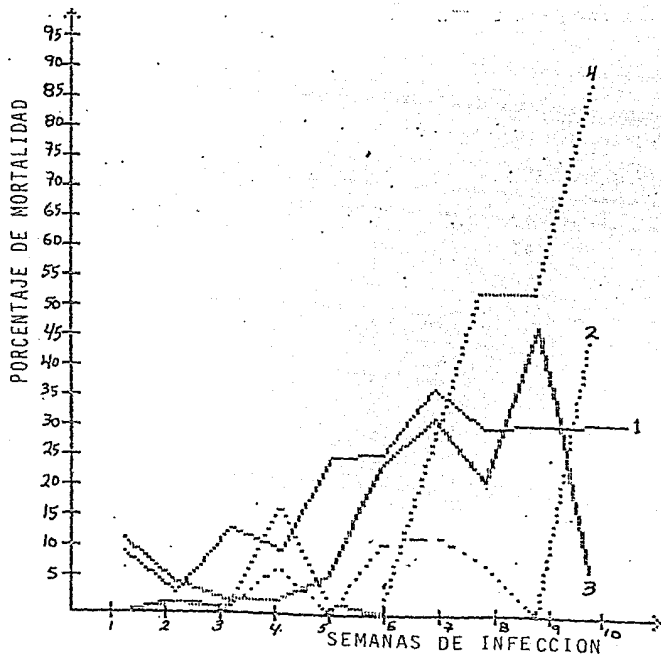
CUADRO 9

CUADRO COMPARATIVO DEL COMPORTAMIENTO EN LA MORTALIDAD DE LOS CARACOLIOS EXPERIMENTALES DE AMBAS POBLACIONES EN EL PERIODO DE INFECCION.

SEMANA	LOCALIDAD	Nº. DE CAR. +	Nº. DE CAR. -	FASE DEL PARASITO
1	EDO. DE MEXICO	0	12	-
	EDO. DE PUEBLA	0	14	-
2	EDO. DE MEXICO	0	4	-
	EDO. DE PUEBLA	0	5	-
3	EDO. DE MEXICO	0	14	-
	EDO. DE PUEBLA	0	2	-
4	EDO. DE MEXICO	5	4	REDIAS INMADURAS
	EDO. DE PUEBLA	0	2	-
5	EDO. DE MEXICO	15	3	REDIAS INMADURAS
	EDO. DE PUEBLA	5	1	REDIAS INMADURAS
6	EDO. DE MEXICO	13	0	REDIAS MED. MADURAS
	EDO. DE PUEBLA	20	0	REDIAS MED. MADURAS
7	EDO. DE MEXICO	13	0	REDIAS MADURAS
	EDO. DE PUEBLA	15	3	REDIAS MADURAS
8	EDO. DE MEXICO	4	2	REDIAS C' CERCARIAS
	EDO. DE PUEBLA	7	1	REDIAS C' CERCARIAS
9	EDO. DE MEXICO	3	1	REDIAS C' CERCARIAS
	EDO. DE PUEBLA	13	1	REDIAS C' CERCARIAS
10	EDO. DE MEXICO	5	2	REDIAS C' CERCARIAS
	EDO. DE PUEBLA	8	3	REDIAS C' CERCARIAS

GRAFICA 1.

COMPORTAMIENTO DE LOS CARACOLES *Lymnaea columella* DE
AMBAS LOCALIDADES DURANTE EL PERIODO DE INFECCION --
CONSIDERANDO EL PORCIENTO DE MORTALIDAD.



- (1) EDO. DE MEXICO (EXPERIMENTAL)
- (2) EDO. DE MEXICO (TESTIGO)
- (3) EDO. DE PUEBLA (EXPERIMENTAL)
- (4) EDO. DE PUEBLA (TESTIGO).

CUADRO 10

DATOS SOBRE EL NUMERO DE FASCIOLAS ADULTAS RECUPERADAS EN CONEJOS INFECTADOS CON METACERCARIAS OBTENIDAS EN LAS CUATRO EXPOSICIONES DE AMBAS LOCALIDADES.

	1a. lih.	2a. lih.	3a. lih.	4a. lih.	combitotal	
					(met.)	
(Fasciolas adultas) EDD. DE MEXICO	10	0	5	7	2	24
(Fasciolas adultas) EDD. DE PUEBLA	17	0	6	16	12	51

CUADRO 11

ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE FASCIOLAS ADULTAS RECUPERADAS EN LOS CONEJOS INFECTADOS CON METACERCARIAS OBTENIDAS EN LAS CUATRO EXPOSICIONES DE AMBAS LOCALIDADES.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F
LOCALIDAD	1	9.35	9.35	3.74 **
LIBERACION	5	67.71	13.54	5.42 *
LOCALIDAD x LIBERAC.	5	10.64	2.128	0.8512**
ERROR	45	112.62	2.50	
TOTAL	56	200.32		

(*) HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P < 0.01$)

(**) NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P > 0.01$; $P > 0.05$)

CUADRO 12

INDICES DE RECUPERACION REGISTRADOS EN CADA UNA DE LAS EXPOSICIONES DE AMBAS POBLACIONES CONSIDERANDO EL NUMERO DE FASCIMIAS RECUPERADAS EN RELACION AL NUMERO DE METACERCARIAS ADMINISTRADAS.

		No. DE MFT.	No. DE ANIM. INF.	No. DE ANIM. PARASIT.	IND. DE PARA SIT.	No. DE ANIM. MUERT.	IND. DE MORT.	No. DE FAS. RECUPER.	IND. DE RECU. RECUPER.	PROM. DE RECU. P/ANIM.
Lymnaea columella EDD. DE MEXICO	1a. LIB	20	5	5	1	0	0	10	.10	2
	2a. LIB	20	5	0	0	0	0	0	.00	0
	3a. LIB	20	5	2	0.4	2	0.4	5	.05	1
	4a. LIB	20	5	4	0.8	1	0.2	7	.07	1.4
	PU LL	20	5	2	0.4	0	0	2	.02	0.4
Lymnaea columella EDD. DE PUEBLA	1a. LIB	20	5	3	0.6	0	0	17	.17	3.4
	2a. LIB	20	5	0	0	0	0	0	.00	0
	3a. LIB	20	5	3	0.6	0	0	6	.06	1.2
	4a. LIB	20	5	5	1	0	0	16	.16	3.2
	PU LL	20	5	4	0.8	0	0	12	.12	2.4

CUADRO 13

DATOS DE LA VIABILIDAD *in vitro* EN LAS METACERCARIAS OBTENIDAS DE LAS CUATRO EXPOSICIONES DE AMBAS POBLACIONES.

	1a. lib.	2a. lib.	3a. lib.	4a. lib.
<u>Lymnaea</u> <u>columnella</u> (EDO. DE MEXICO)	20	20	20	20
NO. DE MET.	50% +	-	40% +	50% +
DESENO. Y %	50% -	100% -	60% -	50% -
<u>Lymnaea</u> <u>columnella</u> (EDO. DE PUEBLA)	20	20	20	20
NO. DE MET.	40% +	5% +	70% +	90% +
DESENO. Y %	60% -	95% -	30% -	10% -

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

- 1) Las dos poblaciones de Lymnaea columella presentan un índice de infección similar con miracidios de Fasciola hepatica; no hubo diferencias significativas ($P > 0.01$; $P > 0.05$)
- 2.- Los caracoles de ambas localidades presentan un comportamiento poblacional similar cuando son infectados con Fasciola hepatica; no existieron diferencias significativas ($P > 0.01$; 0.05) en la mortalidad.
- 3.- El número de caracoles que resultaron liberadores por localidad, fué mayor para la población del Estado de Puebla; además se observaron diferencias muy marcadas en el número de cercarias emitidas por caracol favorable también a los caracoles del Estado de Puebla.
- 4.- En general, la producción de metacercarias es notablemente mayor para la población del Estado de Puebla en relación a la alcanzada por los caracoles del Estado de México; presentaron diferencias significativas ($P < 0.01$)
- 5.- Se podría considerar con base en lo obtenido, una diferencia en la susceptibilidad a la infección con éste tremátodo, favorable a la población del Edo. de Puebla.

A.- La infectividad de las metacercarias obtenidas de ambas localidades, puede considerarse similar, no existieron diferencias significativas ($P > 0.01$; $P > 0.05$), variando unicamente si se considera la edad de los quistes, esto es, la liberación de donde provengan.

LITERATURA CITADA

- 1) Aguirre F.E. 1939. La Limnaea attenuata Say, huesped intermedio de la Fasciola hepatica en la República Mexicana, Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 1.
- 2) Alcibar, M.F., Anaya y D.G.R. y Flores-Crespo, R. 1983. Infectividad y producción de cercarias en caracoles Limnaea cubensis con relación al origen del miracidio. Reunión de Inv. Pec. en Méx.
- 3) Anaya y D.G.R., De Anda, D. y Flores-Crespo R. 1980. Evaluación de productos químicos como molusquicidas en caracoles Limnaea attenuata en condiciones de laboratorio. 1a. Reunión Anual de Parasitología Vet. Resúmenes de trabajos.
- 4) Anaya y D.G.R., De Paz, V.O., Miranda, H.D y Pérez, P.A. 1984. Determinación de la mejor combinación de animal de laboratorio-especie de caracol-carga parasitaria-origen de miracidio, para estudios con Fasciola hepatica. Tec. Pec. en México. 50
- 5) Bacigalupo, J. 1942. Fasciola hepatica. Su ciclo evolutivo en la República Argentina. DISTOMATOSIS HEPATICA. Anales de la Facultad de Veterinaria de Montevideo (Uruguay). 4
- 6) Bodnarz, S. 1960. On the biology and ecology of Galba truncatula -Mull and cercariae of Fasciola hepatica in basin of the river Barcycz. Acta Parasitology. Polon- 8.
- 7) Boch, J. and Supperer, R. 1977. VETERINARMEDIZINISCHE PARASITOLOGIE. CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek. pp. 93-105
- 8) Boray, J.C. and McMichael. 1961. The identity of the Australian lymnaeid snail host of Fasciola hepatica L. and its response to environment. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 12.
- 9) Boray, J. C. 1963 a. Standardization of techniques for pathological and anthelmintic studies with Fasciola spp. Proceeding of the First International conference of the world association for the advancement of Veterinary Parasitology. Hanover. 34.
- 10) Boray, J.C. 1963 b. The ecology of Fasciola hepatica with particular reference to its intermediate host in Australia. Proc. 17th. World. Vet. Congress. Hanover. Section 6.

- 11) Boray, J.C. 1964. Studies on the ecology of Lymnaea lomentosa, the intermediate host of Fasciola hepatica. I. History geographical distribution and environment. Aust. J. Zool. 12.
- 12) Boray, J.C. and Enigk, K. 1964. Laboratory studies on the survival and infectivity of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica metacercariae. Z. Trop. Parasitol. 15 (3).
- 13) Boray, J.C. 1969. Experimental fasciolosis in Australia. Advances in Parasitology. 7. pp. 95-140
- 14) Brenes, R.R., Muñoz, G., Arroyo, G. y Delgado, E. 1968. Estudio preliminar sobre Fasciola hepatica en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 15.
- 15) Brudson, R.V. 1967. Liver fluke Fasciola hepatica in sheep and cattle in New Zealand and its control. N.Z. Vet J. 15.
- 16) Bruning, J. L. and Kintz, L. E. 1977. Computational handbook of Statistics. Library of Congress. Cataloging in Publication data pp. 55-61, 113-119.
- 17) Burch, J. G. 1982. Freshwater snails (Mollusca: Gastropoda) of North America. (Environmental Monitoring and support laboratory office of research and development). U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati Ohio. 249 pp.
- 18) Climo, E. M. and Pullan, N.B. 1972. A taxonomic review of the family Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda) in New Zealand. J. R. Soc. N. Z. 2.
- 19) Coyle, T.J. 1956. Liver Fluke in Uganda. Bulletin of Epizootic Diseases in Africa. 4.
- 20) Cruz-Reyes, A. 1983. Variación en la susceptibilidad de seis especies de limneidos a la infección con Fasciola hepatica. 4a. Reunión Anual de Parasitología Veterinaria. Resúmenes de trabajos.
- 21) Cruz-Reyes, A. 1986. Ciclo evolutivo. FASCIOLASIS. Vol. Conmemorativo centenario del Descubrimiento del ciclo de Fasciola hepatica. Inst. Nal. Inv. For. y Agrop. (INIFAP).
- 22) Dawes, B. 1960. A study of the miracidium of Fasciola hepatica and an account of the mode of penetration of the sporocyst into Lymnaea truncatula in LIBRO HOMENAJE AL DR. EDUARDO CABALLERO Y CABALLERO. Esc. Nal. de Cienc. Biol. IPN. México. pp. 90-110.

- 23) Dawes, B. and Hughes, D. L. 1964. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. In advances in Parasitology, Vol 2, Dawes B., ed. Acad. Press Inc. London. pp. 97-160.
- 24) De Chaneet, G. 1977. *Lymnaea columella* in Western Australia. Proc. Aust. Vet. Assoc. 54 th Annu. Conf.
- 25) De Haro, A. I., Tay, Z. J. y Salazar, S. P. 1982. Estado actual de nuestros conocimientos sobre fascioliasis en México. ZOONOSIS PARASITARIAS. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. pp. 73-76.
- 26) De Jesús, Z. 1935. *Lymnaea philippinensis*, an intermediate host of *Fasciola hepatica* in the Philippines with some observations on the bionomics of the parasite. Philipp. J. Sci. 58.
- 27) De León, D., Ritchie, L. and Chiriboga, J. 1972. Fascioliasis in dairy cattle in the Rio La Plata basin of The Dorado Area. J. Agric. Univ. P. R. 56: 88-92.
- 28) Díaz, L. E. y Archundia, O. J. 1982. Estudio Epizootológico de la susceptibilidad de tres especies de caracoles limneidos al control químico estratégico en el Valle de Toluca. 3a. Reunión Anual de Parasitología Veterinaria. Resúmenes de Trabajos.
- 29) Escudero, C. J. L. y Flores-Crespo, R. 1984. Evaluación de la susceptibilidad de tres especies de caracoles limneidos con miracidios de *Fasciola hepatica* de 2 orígenes. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 250.
- 30) Escudero, C. J. L., García T. C. G. e Ibarra, V. O. F. 1985. Viabilidad e infectividad de la metacercaria de *Fasciola hepatica* obtenida de limneidos infectados a diferentes edades. Reunión de Investigación Pecuaria en México.
- 31) Gómez, A.T., Pérez, R. R. y Zerón, B. F. 1978. Fascioliasis en México. Estado actual y huéspedes intermediarios. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 20.
- 32) González, A. H. A. 1969. Evaluación de las pérdidas económicas ocasionadas por el decomiso parcial o total de hígados en el rastro de Ferrería. TESIS LICENCIATURA. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM.
- 33) Hammond, J. A. 1965. Observation in Fascioliasis in Tanganyika. Bulletin. Epizoot. Dis. Afr. 13. pp. 55-65.
- 34) Harris, R. E. and Charleston, W. A. G.. 1980 Fascioliasis in New Zealand: A review. Veterinary Parasitology. 7.

- 35) Hernández, F. J. 1976. Incidencia de *Fasciola hepatica* y su repercusión económica por decomiso de hígados afectados en el rastro municipal de Toluca, Edo. de México. TESIS LICENCIATURA. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM.
- 36) Hoffman, W. A. 1930., The intermediate host of *Fasciola hepatica* in Puerto Rico. J. Pub. Health and Trop. Med. 6.
- 37) Hubendick, B. 1951. Recent Lymnaeidae. Their variation, morphology taxonomy, nomenclature and distribution. K. Svenska Vetensk. Akad. Handl. 3.
- 38) Itagaki, H. 1958. Relation between the prevalence of fascioliasis and the distribution of the snail intermediate host of the liver fluke. Bull. Biograph. Soc. Japan. 20.
- 39) Jackiewicz, M. 1959. Badania nad Zmiennoscia i stanowiskiem systematy cznym *Galba palustris* O.F. Mull. Poznanski Tow. Przyj. Nauk. Wydz. Mat. Pazyr Prace Komisji Biologicznej.
- 40) Kawana, H. 1940. Study on the development of the excretory system of *Fasciola hepatica* L. with special reference to its first inntermediate host in Central China. J. Shanghai. Sci. Inst. 5.
- 41) Kendall, S. B. 1949. Bionomics of *Lymnaea truncatula* and the parthenitae of *Fasciola hepatica* under drought conditions. J. Helminthol. 23.
- 42) Kendall, S.B. 1965. Relationship between the species of *Fasciola* and their Molluscan host. Advances in Parasitology. 3. pp. 62-91
- 43) Krull, W. H. 1933 a. The snail *Pseudosuccinea columella* (Say) as a potential important intermediate host in extending the range of *Fasciola hepatica*. Linn. J. Wash. Acad. Sci. 23.
- 44) Krull, W. H. 1933 b. A new snail and rabbit host for *Fasciola hepatica*. Linn. J. Parasitology. 20.
- 45) Krull, W. H. 1934. The intermediate hosts of *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in the United States. North American Veterinary. 15.
- 46) Landeros, V. M. A., Ibarra, V. F., Escudero, C. J. L. y Milián, S. F. 1981. Determinación de algunos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*, en la cuenca lechera de Tulancingo, Hidalgo. Tec. Pec. en México. 40.
- 47) Lang, B. Z. 1977. Snail and mammalian hosts for *Fasciola hepatica* in Eastern Washington. The Journal of Parasitology. 63.

- 48) Lapage, G. 1971. Parasitologia Veterinaria. C.E.C.S.A. México. pp. 235-241.
- 49) Leimbacher, F., Rondelaud, G. et Morel, C. 1972. L'hôte intermédiaire de la grande douve en France. Cahiers de l'élevage No. 402. Paris, France. Inst. Tech. de Elevage ovin et caprin. Fédération Nationale ovine.
- 50) Lynch, J. J. 1965. The ecology of Lymnaea tomentosa (Pfeiffer, 1895) in South Australia. Aust. J. Zoo. 13.
- 51) Malek, E. A. 1962. Laboratory Guide and Notes for Medical Malacology. Burgess Publishing Company. Minneapolis.
- 52) Malek, E. A. and Cheng, I. C. 1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press. New York and London. pp. 119-127.
- 53) Malek, E. A. 1980. Snail-transmitted Parasitic Diseases. CRC. Press. Florida II. pp. 131-137.
- 54) Mazzotti, L. 1955. Lymnaea obrussa (Say), huesped intermediario de Fasciola hepatica. Rev. del Inst. de Salub. y Enfermedades Tropicales. 15.
- 55) Mazzotti, L. 1956. Lymnaea humilis (Say), huesped intermediario de Fasciola hepatica. Rev. Inst. de Salub. y Enfermedades tropicales. 16.
- 56) Milián, S. F. 1986. Pronóstico médico y económico. FASCIOLASIS. Vol. Conmemorativo Centenario del Descubrimiento del ciclo de Fasciola hepatica. Inst. Nal. Inv. For. y Agrup. (INIFAP).
- 57) Monroy, B. J., Guzmán, A. A., Márquez, M. R., Fajardo, M. R. y Flores-Crespo, R. 1985. Estudio hemático en ovinos gemelos infectados artificialmente. Memoria de la 6a. Reunión Anual de Parasitología Vet. Morelia, Mich.
- 58) Muñoz-Rivas, G. 1954. Fasciolosis experimental. Rev. Acad. Colomb. 9.
- 59) Nájera, F. R. A. 1982. Fasciolosis. ZOONOSIS PARASITARIAS. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. pp. 237-242.
- 60) Nieto, C. J., Trejo, C. L. y Jaime, N. J. 1985. Comparación de la susceptibilidad a infección con Fasciola hepatica y Paramphistomum colicophorum en 4 especies de limneidos del Estado de Morelos. Reunión de Investigación Pecuaria en México.

- 61) Olsen, O. W. 1944. Bionomics of the lymnaeid snail, Stagnicola bulimoides techella, the intermediate host of the liver fluke in Southern-Texas. J. Agric. Res. 69.
- 62) Olsen, O. W. 1977. Parasitologia animal. Tomo II: Platelminfos, Acantocéfalos y Nematelmintos. Ed. AEDOS. Barcelona, España. 1a. ed en Español de la 3a. ed. en Inglés (1974). pp. 394-396.
- 63) Ollerenshaw, C. B. 1967. Some observations on the epidemiology and Control of fascioliasis in Wales. Second International Liver Fluke Colloquium. 103-125.
- 64) Ollerenshaw, C. B. 1971. Quelques aspects des relations entre le climat et l'incidence de la fasciolose en Europe. Le cahier de Med. Vet. 40. pp. 303-319.
- 65) Orozco, V. L., Arroyo, B. S., López, F. R. y Escudero, J. 1984. Prevalencia de fascioliasis bovina en 10 ranchos del Distrito de Temporal I. Villahermosa, Tabasco. Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México.
- 66) Pantelouris, E. M. 1965. The common liver fluke Fasciola hepatica L. Pergamon Press. Oxford. pp. 3-21.
- 67) Petrochenko, V. I. 1954. Veduscaia rol mollusca malogo prudovika (Galba truncatula). V. Rasprostraneni fascioleza. Zool. Zurnal. 33.
- 68) Ponder, W.F. 1975. The occurrence of Lymnaea (Pseudosuccinea) columella, an intermediate host of Fasciola hepatica, in Australia. Aust. Vet. J. 51.
- 69) Price, E. W. 1953. The fluke situation in American ruminants. J. Parasitology. 39.
- 70) Pullan, N. B. 1969. The first report in New Zealand of Lymnaea columella Say (Mollusca: Gastropoda) and intermediate host of liver fluke Fasciola hepatica L. N. Z. Vet. J. 17: 255-256.
- 71) Pullan, N. B. and Whitten, L. K. 1972. Liver fluke Fasciola hepatica in New Zealand. Part. I. A spreading parasite in sheep and cattle. N. Z. Vet. J. 20.
- 72) Quiroz, R. H. 1978. Fascioliasis subclínica. Memorias del curso de actualización: enfermedades parasitarias del ganado bovino. UNAM. pp. 63-71.
- 73) Quiroz, R. H. 1986. Epidemiología. FASCIOLIASIS. Vol. Conmemorativo Centenario del Descubrimiento del Ciclo de Fasciola hepática. Inst. Nal. de Inv. For. y Agrup. (INIFAP).

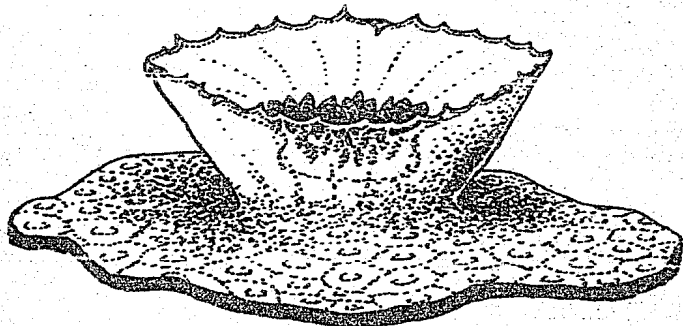
- 74) Rafyi, A. et Eslami, H. 1971. Etal actual de nos connaissances sur les fascioloses en Iran. Les Cahiers de Medicine Veterinaire. 6.
- 75) Ramirez, V. J. J. y Vergani, F. 1949. Contribución al estudio del ciclo evolutivo de la *Fasciola hepatica* en Venezuela. Rev. Grancolomb. Zootec. 3.
- 76) Regalado, O.E. 1980. Repercusión económica por decomiso de higados afectados por fasciolosis en el Estado de Tabasco. TESIS LICENCIATURA. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM.
- 77) Roberts, E. W. 1950. Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Lynnaeus) and of its snail host, *Lymnaea (Galba) truncatula* (Muller) in the field and under controlled condition in the laboratory. Ann. Trop. Med. Parasit. 44.
- 78) Sampaio, X. L., Martinez, F. A. R. and Mattos, dos S. M. A. 1967. The susceptibility to *Fasciola hepatica* of some fresh-water snail in Portugal and Spain. Second. Inter. Liver fluke colloquium. 179.
- 79) Sánchez, A. A., Herrera, R. D. y Barrios, D. Z. 1976. Incidencia de fasciolosis y su valoración económica a partir de higados decomisados de ganado Holstein nativo de la región, sacrificado en el rastro municipal de Tulancingo, Hgo. Tec. Pec. en México. 30.
- 80) Sánchez, P. M. 1985. Susceptibilidad a *Fasciola hepatica* de 3 especies de caracoles limneidos a diferentes edades con dos métodos distintos de infección. Reunión de Inv. Pec. en México.
- 81) Santos, V. C. 1984. Datos preliminares sobre la prevalencia de *Fasciola hepatica*, en dos especies de caracoles de Atlangatepec, Tlax. Memorias de la 5a. Reunión Anual de Parasitología Veterinaria.
- 82) Schadin, W. I. 1937. Einige Feld-und experimentelle Untersuchungen an *Lymnaea truncatula*. Mull. dem U-ertrager der Fasciolosis. Trans. Inst. Zool. Acad. Sci. URSS. 4.
- 83) Shaw, J. N. and Simms, B. T. 1930. Studies in fascioliasis in Oregon sheep and goats. Oregon Agric. Exper. Station Bull. 266.
- 84) Shaw, J. N. 1931. Some notes on liver fluke investigations. J. Amer. Vet. Med. Assn. 31.
- 85) Shirai, M. 1925. On the intermediate host of *Fasciola hepatica* in Japan. Sci. Rept. Gov. Inst. Inf. Dis. Tokyo. Imp. Univ. 4.

- 86) Sinitzin, D.F. 1929. Rediae and cercariae of *Fasciola hepatica* found in water snails, *Galba bulimoides* *tebbella*. J. Parasitology. 15.
- 87) Soulsby, E. J. L. 1982. Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals. Edit. Bailliere Tindall, London Seventh Edition. pp. 40-50.
- 88) Srivastava, H.D. 1944. The intermediate host of *Fasciola hepatica* in India. Proc. Indian. Sci. Congr. III.
- 89) Tagle, V. I. 1944. Observaciones sobre la evolución de la *Fasciola hepatica*, Linneo, 1758. Comprobación del huesped intermediario en Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. 46-47.
- 90) Taylor, M. 1922, Water-snails and liver flukes. Nature. 110.
- 91) Taylor, E. L. 1965. La fasciolosis y el Distoma hepático. FAO: Estudios Agropecuarios. No. 64:250 pp.
- 92) Trejo, C. L. y Cruz, L. A. 1981. Gastropodos pulmonados dulceacuicolas (identificación) e importancia en el ciclo biológico de *Fasciola hepatica* en el Estado de Puebla. 2a. Reunión Anual de Parasitología Vet. 13. Resúmenes de trabajos.
- 93) Trejo, C. L., Mata, R. E., González, O. A., Casas, R. J.L. y Salinas, H. 1982. Epidemiología de la fasciolosis bovina en el Estado de Durango. 3a. Reunión Anual de Parasitología Vet. Resúmenes de trabajos.
- 94) Trejo, C. L., Mata, R. E., González, O. A. y García, V. 7. 1983. Estudio integrado de la fasciolosis bovina en el Estado de Durango. Reunión de Invest. Pecuaria en México. pp. 254-257.
- 95) Trejo, R. J. A. 1974. Valoración de la efectividad de 3 fasciolocidas en ovinos y caprinos bajo condiciones de campo. TESIS LICENCIATURA. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM.
- 96) Ueno, H., Alvarez, V. J., De Mergen, A. M. and Sánchez, V.M. 1973. Observation on the prevalence of parasitic diseases in cattle, especially fascioliasis in the Dominican Republic. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 13.
- 97) Ueno, H., Arandia, R. C., Morales, G. L. and Medina, M. G. 1975. Fascioliasis of Livestock and snail host for *Fasciola* in the Altiplano Region of Bolivia. Nat. Inst. Animal. Hlth. Quart. 15.

- 98) Van Eeden, J. A. and Brown, D. G. 1966. Colonization of fresh waters in the Republic of South Africa by Lymnaea columella Say (Mollusca: Gastropoda). Nature. London. 210.
- 99) Van Volkenberg, H. L. 1929. Report of the Parasitologist. Rep. Puerto Rico. Agric. Exper. Station.
- 100) Watanabe, S. 1955. Infestation of Fasciola hepatica in Lymnaea truncatula in Niigata Prefecture. J. Jap. Vet. Med. Ass. 8.
- 101) Watanabe, S. 1967. Fascioliasis of ruminants in Japan. Jap. Agric. Res. Q, 2: 22-27.
- 102) Wayne, W. D. 1977. Biostatística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. México. 485 pp.
- 103) Whitney, H., Villeneuve, A. and Fréchette, J. L. 1981. (LETTER TO THE EDITOR). Can. Vet. J. 22:334.
- 104) Wilson, G. I. and Samson, K.S. 1971. The incidence of fascioliasis of sheep and cattle in the South west with observations on the snail vectores. Proc. Helminth. Soc. Wash. 38:52-56.
- 105) Wilson, R. A., Paullin, R. and Denison, J. 1971. A investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of miracidium of Fasciola hepatica in to its snail host Lymnaea truncatula. Parasitology. 63:491-500.
- 106) Yamaguti, S. 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vol. I. Satyu Yamaguti. Kyoto, Japan. pp: 718-719.

Fig.
56

Hepaticae



Diseminación de yemas en *Marchantia polymorpha* L. (Hepaticae)

Clementina de Los Angeles Equihua Zamora

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

1986