

R. 3978

T/25.599.5.2.221 LU2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

(Sanidad Animal)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310716015

**EPIZOOTIOLOGIA DE LA FASCIOSIS
EN LA ZONA CENTRO DE ESPAÑA:
CRONOBIOLOGIA DE LAS FASES
DE VIDA LIBRE Y EN EL HOSPEDADOR
INTERMEDIARIO EN LAS CONDICIONES
CLIMATICAS DE MADRID**



Mónica Luzón Peña

Madrid, 1991

Colección Tesis Doctorales. N.º 331/91

© Mónica Luzón Peña

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1991.**

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-42088-1991



La Tesis Doctoral de D. Mónica Luzón Peña.....

.....
Titulada **Etiopatología De La Escrolosis En La Zona Centro De**

España: Cronobiología de las Fases De Vida Libre Y En El Hospedador. Interme-
-diario En Las Condiciones Climáticas De Madrid.

Director Dr. D. Mercedes Gómez-Bautista y Francisco A. Tejedor Vázquez.

fue leída en la Facultad de .. Veterinaria.....

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día 27 de

de febrero..... de 19⁹¹....., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE .. Antonio Martínez Fernández.....

VOCAL .. Miguel Cordero del Campillo.....

VOCAL .. Santiago Mas Coma.....

VOCAL .. Jose María Tarazona Vilas.....

SECRETARIO .. Jose María Alunda Rodríguez.....

.....
habiendo recibido la calificación de .. Apto. "Cum Laude"....

Por Unanidad.
.....

Madrid, a once de febrero de 1991 .

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I (SANTIDAD ANIMAL)**



**EPIZOOTIOLOGIA DE LA FASCIOLISIS EN LA ZONA CENTRO DE ESPAÑA:
CRONOBIOLOGIA DE LAS FASES DE VIDA LIBRE Y EN EL HOSPEDADOR
INTERMEDIARIO EN LAS CONDICIONES CLIMATICAS DE MADRID.**

**Dña. Mónica Luxán Peña
Licenciada en Veterinaria**

Madrid, enero de 1991

MERCEDES GOMEZ BAUTISTA, Doctora en Farmacia y Profesora Titular de Parasitología y Enfermedades Parasitarias adscrita al Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

FRANCISCO A. ROJO VAZQUEZ, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Parasitología y Enfermedades Parasitarias adscrito al Departamento de Patología Animal (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León,

CERTIFICAN:

que la memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. Mónica Luzón Peña titulada: "Epizootiología de la fasciolosis en la zona centro de España. Cronobiología de las fases de vida libre y en el hospedador intermediario en las condiciones climáticas de Madrid" para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección en las instalaciones de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple, a nuestro entender, los requisitos exigibles para la obtención de dicho grado.

Lo que firmamos en Madrid a ocho de enero de mil novecientos noventa y uno.

Francisco A. Rojo Vazquez



A mis padres

Este trabajo se ha realizado con la colaboración de muchas personas. A todos agradezco de verdad su ayuda.

Primero, a mis maestros, el Prof. Dr. Francisco A. Rojo Vázquez, cuya acogida, valiosa orientación y estímulo me iniciaron en la especialidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, y la Prof. Dra. Mercedes Gómez Bautista, quien me enseñó la importancia del método y rigor científicos. Ambos, codirectores de esta memoria, con su enseñanza, dedicación y continuo apoyo, me han guiado en todo momento e inculcado la confianza para seguir adelante. Debo además al Prof. Rojo Vázquez, como anterior Director de este Departamento, la oportunidad de pertenecer a esta Unidad y al equipo de trabajo actualmente dirigido por la Prof. Gómez Bautista, cuya confianza, dedicación y sacrificio agradezco muy de veras. Queda patente mi admiración por ambos, bajo cuya constante dirección y ayuda este trabajo ha podido llegar a término.

A Sonia Olmeda, quien vivió conmigo, como alumna interna, todos los buenos y malos ratos del inicio de este trabajo y nunca me ha faltado su apoyo. A Concha de la Fuente, con quien siempre he podido contar. Con ambas comparto laboratorio y amistad.

A mis compañeros de equipo: Juan Manuel Troncoso, Luis Miguel Ortega y Eduardo Murillo, cuyo compañerismo me ha permitido compartir, y posiblemente "acaparar" en los últimos meses, la dedicación de nuestros codirectores. Especialmente a Juan Manuel Troncoso, por su generosa ayuda.

Al Profesor Dr. J.M. Alunda, por sus consejos.

A Guadalupe Miró, cuya experiencia clínica me ha sacado de más de un apuro en el manejo y cuidado de mis "bichos".

Agradezco a todos los alumnos internos su participación en las tareas de laboratorio, en especial, a Cinta Prieto, por su valiosa colaboración.

A todos mis compañeros de la unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias y a los demás miembros del Departamento de Patología Animal I, por su apoyo.

A mi madre, por su infinita paciencia. A mi hermano Diego, mi "maestro" particular.

INDICE

INTRODUCCION

1.- REVISION BIBLIOGRAFICA.....	1
1.1.- BREVE RESEÑA DEL CICLO BIOLÓGICO DE Fasciola hepatica	1
1.2.- EPIZOOTIOLOGIA DE LA FASCIOSIS.....	2
1.2.1.- Factores que influyen en el desarrollo del huevo	2
1.2.1.a.- Temperatura.....	2
1.2.1.b.- Humedad.....	13
1.2.1.c.- Intensidad de luz.....	14
1.2.1.d.- Tensión de oxígeno.....	15
1.2.1.e.- Concentración de hidrógeno libre (pH).....	16
1.2.1.f.- Otros factores.....	16
1.2.2.- Factores que influyen en la eclosión del miracidio	17
1.2.3.- Factores que influyen en la supervivencia y longevidad del miracidio.....	18
1.2.4.- Relación Fasciola hepatica/hospedador intermediario.....	19
1.2.4.a.- Receptividad del Hospedador Intermediario.....	21
1.2.4.b.- Efecto del parasitismo sobre el H.I.....	23
1.2.5.- Factores que influyen en el desarrollo del parásito en el H.I.....	25
1.2.5.a.- Temperatura.....	25
1.2.5.b.- Humedad.....	36
1.2.5.c.- Nutrición.....	38
1.2.6.- Factores que influyen en la emisión de cercarias.....	39
1.2.7.- Factores que influyen en el enquistamiento de las cercarias.....	41
1.2.8.- Resistencia de las metecercarias a las condiciones ambientales.....	42
1.2.9.- DINAMICA DE TRANSMISION AL HOSPEDADOR DEFINITIVO...	45

2.- <u>MATERIAL Y METODOS</u>	48
2.1.- ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE LOS HUEVOS DE <u>Fasciola hepatica</u>	49
2.1.1.- Diseño experimental.	51
2.1.1.a.- EXPERIENCIA I.	51
2.1.1.b.- EXPERIENCIA II.	55
2.1.2.- Recinto experimental.	58
2.1.3.- Registro de los datos meteorológicos.	60
2.1.4.- Origen de las heces contaminantes de huevos de <u>Fasciola hepatica</u>	60
2.1.5.- Formación de los lotes de heces y de los cultivos en agua.	62
2.1.6.- Estudio del ritmo de liberación espontánea de los huevos de la materia fecal al agua.	63
2.1.7.- Estudio del desarrollo de los huevos de <u>Fasciola hepatica</u>	64
2.1.7.a.- Criterio cualitativo de valoración.	64
2.1.7.b.- Criterio cuantitativo de valoración.	66
2.2.- ESTUDIO DE LA RELACION <u>Fasciola hepatica</u> - <u>hospedador intermediario</u>	66
2.2.1.- Diseño experimental.	66
2.2.1.a.- Desarrollo larvario intramolusco (EXPERIENCIA III).	66
2.2.1.b.- Periodo de emisión de cercarias (EXPERIENCIA IV).	68
2.2.2.- Hospedador intermediario.	69
2.2.2.a.- Espacio.	69
2.2.2.b.- Hábitats y alimentación.	69
2.2.3.- Evaluación del desarrollo larvario y de los periodos de emisión.	70
2.3.- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS METACERCARIAS.	70
2.3.1.- Diseño experimental.	71

2.3.2.- Obtención de las muestras.....	71
2.3.3.- Desenguistamiento "in vitro".....	72
2.3.4.- Análisis de resultados.....	73
2.3.4.a.- Valoración cualitativa.....	73
2.3.4.b.- Valoración cuantitativa.....	73
2.4.- MATERIAL.....	74
3.- RESULTADOS	77
3.1.- ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LOS HUEVOS DE <i>F. hepatica</i> EN LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE MADRID.....	78
3.1.a.- Periodo de temperaturas medias mensuales inferiores a 10°C.....	78
3.1.b.- Periodo de temperaturas medias próximas a 10°C (marzo-abril).....	106
3.1.c.- Periodo de temperaturas mínimas superiores a 10°C.....	116
3.2.- ESTUDIO DEL RITMO DE LIBERACION DE LOS HUEVOS DE LAS HECES.....	145
3.3.- ESTUDIO DE LA RELACION <u><i>Fasciola hepatica-Lymnaea</i></u> <u><i>truncatula</i></u>	147
3.3.1.- Factores relacionados con la infestación (periodo de desarrollo larvario intramolusco, tasas de supervivencia, infestación y emisión).....	147
3.3.2.- Dinámica de las poblaciones en emisión (supervivencia y actividad de las limneas durante el periodo de emisión de cercarias).....	154
3.4.- ESTUDIO SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LAS METACERCARIAS.....	170
4.- <u>DISCUSION</u>	178
5.- <u>CONCLUSIONES</u>	204
6.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	208

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las infestaciones por helmintos en el ganado vacuno y ovino son muy frecuentes, aunque no todas las especies de parásitos tienen la misma distribución e importancia económica.

Los ecosistemas condicionan, por una parte la presencia de una determinada especie parásita y, por otra, la intensidad de los parasitismos. Las comunidades bióticas de los pastos son muy diferentes; los caracteres geográficos, geológicos y climáticos condicionan la presencia y tamaño de las poblaciones de moluscos que intervienen en el ciclo biológico como hospedadores intermediarios de los helmintos de los ruminantes domésticos y, en consecuencia, caracterizan la epizootiología de los parasitismos o parasitosis, según los casos.

Desde el punto de vista sanitario, en los animales domésticos, son más normales los "parasitismos subclínicos" mientras que las infestaciones clínicas son poco frecuentes. No obstante y por diversas causas, pueden producirse infestaciones severas y brotes que afecten a muchos animales y provoquen elevada mortalidad. En líneas generales, puede decirse que el grado de significación de una determinada infestación está relacionado, de forma casi invariable, con el número de parásitos presente en un hospedador, a su vez condicionado por muy diversos factores.

Según el Índice-catálogo de zoonosis ibéricas (Cordero del Campillo y col., 1980), las infestaciones por Fasciola hepática se han denunciado en toda España. No obstante, sólo existen cifras de prevalencia en algunas zonas geográficas. Por otra parte, no hay muchos datos epizootiológicos referidos a las épocas de riesgo de infestación de los hospedadores intermediarios y los definitivos, la resistencia de las fases libres, ni la duración del desarrollo larvario intramolusco en las distintas condiciones climáticas.

En la submeseta meridional de España, las infestaciones por Fasciola hepatica no tienen una elevada incidencia (4.4%) y son prevalentes en áreas irrigadas o en las que existen hábitats permanentes de Lymnaea truncatula. Por eso, los estudios realizados en diferentes lugares de la zona central de España demuestran grandes diferencias en cuanto a la incidencia (Simón Vicente & Ramajo Martín, 1983; Gonzalez Lanza y col., 1989).

Aunque es más frecuente la fasciolosis crónica -que suele aparecer en otoño e invierno-, pueden presentarse brotes agudos o subagudos y la muerte repentina de los animales en circunstancias estrechamente relacionadas con alteraciones de las condiciones climáticas propias de la zona.

La elevada influencia de los factores climáticos sobre la fasciolosis de los ruminantes hace que, tanto el parásito como su hospedador intermediario, respondan con gran rapidez ante cualquier variación climática, alterándose, en consecuencia, la frecuencia e intensidad de esta parasitosis. Tal grado de interrelación ha servido para establecer múltiples modelos matemáticos que, basados en la climatología, permiten predecir con gran precisión las épocas y años de mayor riesgo.

Así pues, las condiciones meteorológicas, propias de cada época y de cada área geográfica, asociadas a los sistemas de pastoreo aplicables en las mismas, son los principales factores que condicionan la forma de presentación (aguda, subaguda o crónica) y, por tanto, su importancia económica. Por otra parte, hay grandes diferencias entre los pastos que permiten mantener una elevada carga ganadera y los que soportan una carga menor, en los que la mayor diseminación de las heces reducirá las posibilidades de transmisión del parásito.

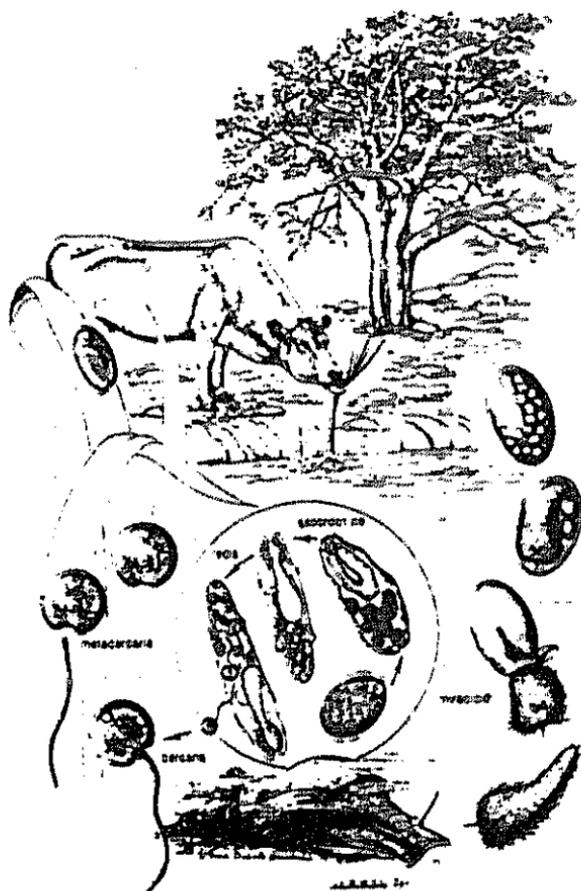
El conocimiento de la cronobiología de Fasciola hepatica en sus fases de vida libre y en el hospedador intermediario, en las

condiciones climáticas propias de cada zona, permite establecer las épocas de riesgo de infestación para el hospedador definitivo y, por consiguiente, tomar las medidas oportunas para evitar las pérdidas por ella producidas. El escaso número de trabajos realizados al respecto en España, nos ha llevado a realizar este estudio, con el fin de establecer el modelo de desarrollo y transmisión de ~~Fasciola hepatica~~ en las condiciones climáticas de Madrid.

1.- REVISION BIBLIOGRAFICA

1.- REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1.- BREVE RESERVA DEL CICLO BIOLÓGICO DE *Fasciola hepatica*



(según Georgy & Georgy, 1990)

1.2.- EPIZOOTIOLOGIA DE LA FASCIOLOSIS

1.2.1.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL HUEVO

1.2.1.a.- TEMPERATURA

En 1883, ya Thomas (cit. por Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960) indicó que los huevos de Fasciola hepatica no se desarrollan mientras permanecen en el hospedador definitivo o, en el exterior, si están incluidos en la masa fecal. Este autor observó en trabajos de campo que, una vez liberados de las heces al agua, el desarrollo de los huevos está condicionado por la temperatura, que es inhibitoria por debajo de 10°C y óptima entre 23-26°C.

Con posterioridad, diversos autores han realizado estudios sobre la influencia de la temperatura en el desarrollo de los huevos de Fasciola hepatica. Un extenso trabajo es el de Rowcliffe & Ollerenshaw (1960), que establecen el rango térmico de desarrollo de los huevos en 10-30°C y la temperatura óptima en 27°C. Muchos son los investigadores que han indicado la duración del desarrollo de los huevos a temperatura constante y mientras existe un acuerdo unánime en cuanto al rango de temperaturas a las que éste se produce, no sucede así al establecer la temperatura, entre 25-30°C, a la que sucede el desarrollo hasta miracidio en un tiempo más corto, o el tiempo en que tiene lugar el 50% de eclosión a una temperatura determinada, como se indica en el siguiente Cuadro:

A U T O R	DÍAS DE DESARROLLO A TEMPERATURA CONSTANTE										
	10 °C	15 °C	16 °C	18 °C	20 °C	22 °C	25 °C	26 °C	27 °C	28 °C	30 °C
(1)			45				15				
(2)		40						12			
(3)		40		27	20		11		10		
(4)	116		32	24	19	16		12		10	9
(5)		56		50	27		17		22		

(1) Jepps (1933) (2) Kendall (1965) (3) Ollerenshaw (1971a)
 (4) Al-Habbib (1974) (en Al-Habbib & Grainger, 1983)
 (5) Díez Baños & Rojo Vázquez (1976)

En general, todos los autores aprecian que en el rango de 10-30°C, el tiempo necesario para el desarrollo disminuye de forma regular al aumentar la temperatura, aunque también aumenta la mortalidad, afectándose seriamente la capacidad de supervivencia por las temperaturas superiores a 30°C.

Aunque determinar el valor exacto de la temperatura crítica por encima de la cual se produce desarrollo no era fácil en los tiempos en que Rowcliffe & Ollerenshaw (1960) realizaron sus experiencias, parece existir una relativa precisión si se asume que el valor crítico se sitúa entre 9-10°C. Considerando como temperatura crítica 9.5°C, es posible calcular el número de grados-día que -a temperaturas constantes- serían necesarios para el desarrollo y eclosión de los huevos de *E.hepatica* -número de grados/día= (T-9.5)x días requeridos para el desarrollo a T° °C- y, consecuentemente, debería existir una constante térmica. Sin embargo, los grados-día calculados varían con la temperatura, más marcadamente por debajo de 15°C, y parece que solamente existe una constante

térmica para el rango 18-23°C, en el que, efectivamente, ésta se sitúa entre 200-220 grados/día, según los resultados de Rowcliffe & Ollerenshaw (1960), y entre 194-208 para los de Al-Habbib (en Al-Habbib & Grainger, 1983). La no existencia de una constante térmica para todo el rango de desarrollo de los huevos (10-30°C) parece indicar que existen otros factores que, asociados a la temperatura, influyen sobre la embrionación.

A partir de los resultados de tiempos de desarrollo de los huevos a temperaturas constantes, obtenidos por Ollerenshaw (1971a) y por Al-Habbib (1974, cit. por Al-Habbib & Grainger, 1983), se han desarrollado modelos matemáticos de estimación del tiempo de desarrollo. El modelo logarítmico simple, $\text{LnDt} = a_0T + a_1$ con valor para las constantes $a_0 = -0.1170$ ó -0.1193 y $a_1 = 5.370$ ó 5.549 (para los datos de uno u otro

autor), tiende a exagerar la velocidad de desarrollo a bajas temperaturas. Un modelo con mayor precisión entre los tiempos observados y estimados parece ser de la forma siguiente:

$D_T = C_0 \exp(C_1T) + C_1T + C_3/T^2$, con valores para $C_0 = -282.5$, $C_1 = -0.117$, $C_2 = -173.5$ y $C_3 = 22106$. Sin embargo, esta fórmula no permite establecer la significación de las diferencias entre los valores estimados y los observados. Connolly & Grainger (cit. por Hope Cawdery y col., 1978 y Al-Habbib & Grainger, 1983) han desarrollado un modelo que permita conocer la significación de estas diferencias y que responde a la fórmula: $D_T = 1/(B_0 + B_1T + B_2T^2 + B_3T^3)$ siendo los coeficientes $B_0 = 0.0245$, $B_1 = -0.00620$, $B_2 = 0.000544$ y $B_3 = -0.0000823$.

La temperatura máxima a la que exista desarrollo de los huevos ha sido establecida en 30°C. Aunque Borchert (1964), en su tratado de "Parasitología Veterinaria", indica que puede existir desarrollo a temperaturas superiores, la mayoría de los autores coinciden al señalar que las temperaturas por

encima de 30°C no solamente inhiben el desarrollo de los huevos sino que su acción tiene un efecto negativo sobre la ulterior evolución de los mismos a temperaturas favorables.

Con el fin de conocer la influencia que el periodo de tránsito por el hospedador definitivo pueda tener sobre el desarrollo de los huevos, diversos autores han analizado el efecto del tiempo de permanencia a 37°C sobre su ulterior desarrollo a temperaturas óptimas. Rowcliffe & Ollerenshaw (1960) señalan que, a partir del tercer día de preincubación, existe un retraso en el desarrollo de los miracidios en relación directa al tiempo de permanencia a 37°C, a la vez que un progresivo aumento de la mortalidad, siendo ésta del 100% después de 24 días a 37°C, dato que, posteriormente, sería confirmado por los resultados de Simón Vicente (1971). Estos datos son ampliados por los resultados de Vázquez Gómez y col. (1985) que, en huevos extraídos directamente de vesícula biliar y preincubados a 37°C, durante 24 o 48 horas, observan mayor desarrollo que cuando éstos son sometidos directamente a una temperatura óptima (26°C), aunque la preincubación provocó una mayor mortalidad.

Con independencia de los errores que se cometen con una simulación de este tipo -desconocimiento de la edad real de los huevos aun habiendo sido extraídos de la vesícula biliar y condiciones de trabajo que pueden alejarse de las que existen en el tránsito intestinal-, estos resultados parecen indicar que la retención de los huevos en el tracto digestivo, por periodos superiores a los fisiológicos (26-30 horas), es desfavorable para P. hepatica. Al igual que lo son las preincubaciones a 35°C (Díez Baños & Rojo Vázquez, 1976) o la acción de forma constante de cualquier temperatura superior a los 30°C, tal como se indica en el siguiente Cuadro:

TEMPERATURA °C	DIAS PARA ECLOSION	MORTALIDAD (%)	REFERENCIA AUTORES
12-31	11.98	58.6	(2)
34	12.60	98.3	(2)
35	----	100	(2) Y (3)
37	----	100	(1) Y (3)
40	----	100	(3)

(1) Bowcliffe & Ollerenshaw (1960)

(2) Al-Habbib (1974)

(3) Díez Baños & Bojo Vázquez (1976)

Bowcliffe & Ollerenshaw (1960) establecen la temperatura mínima a la que existe desarrollo en 9-10°C (9.5±0.5°C); resultados que, según indican los autores, confirman los de Thomas (1883), Ross & McKay (1929) y Rowan (1956) y que son, posteriormente, corroborados por diversos investigadores. A temperaturas inferiores a 10°C se inhibe el desarrollo, pero los huevos mantienen la viabilidad mientras ésta no descienda de 0°C. Así, se ha observado que los huevos sobreviven, en cualquier estadio de su desarrollo, hasta 12 meses a 4-5°C (Boray, 1969) y que, a temperatura favorable (>10°C), existe posibilidad de evolución hasta la formación de miracidios en huevos mantenidos durante dos años y medio en refrigeración (4-5°C) siendo éstos infestantes para LYNNAEA CORNETOSA (Krull, 1934, cit. por Boray, 1969).

No parecen existir importantes diferencias dependientes de la temperatura de preincubación en el rango de 0 a 8 °C; sin

embargo, el tiempo de permanencia a temperaturas inferiores a 10°C influye notablemente sobre la capacidad de desarrollo, tanto sobre la mortalidad como la velocidad de embrionación, y así, Al-Habbib & Grainger (1983) observan una mayor mortalidad de los huevos preincubados 60 días que 30 a temperaturas entre 0-6°C y Díez Baños & Rojo Vázquez (1976) no consiguen desarrollo cuando las bajas temperaturas (4-5°C) actúan durante más de 3 meses. Respecto a su influencia sobre la velocidad de desarrollo, los resultados son contradictorios y, mientras en las experiencias de Díez Baños & Rojo Vázquez (1976) estos tiempos se acortan al aumentar el periodo de preincubación, Vázquez Gómez y col. (1985) aprecian que, con preincubaciones a 8°C durante 15 o 30 días, se mantiene la capacidad de embrionación, aunque la velocidad de desarrollo desciende al aumentar el tiempo de preincubación.

Las temperaturas inferiores a 0°C comprometen la viabilidad de los huevos de forma irreversible, aun actuando en tiempos cortos. En trabajos de laboratorio, diversos autores han comprobado el efecto letal de las temperaturas de congelación, observando que a 15°C por debajo de cero los huevos mueren en dos días; en tiempos algo más prolongados a temperaturas menos extremas, y que en ningún caso los huevos llegan a desarrollarse o eclosionar cuando han sido sometidos a temperaturas por debajo de cero grados (Boray, 1969; Over, 1971; Ollerenshaw, 1974; Díez Baños & Rojo Vázquez, 1976).

Es difícil, sin embargo, conocer la influencia de las temperaturas inferiores a 10°C o superiores a 30°C sobre la capacidad de desarrollo de los huevos, pues los resultados que se obtienen son dependientes de la acción de esas temperaturas a las que no existe desarrollo y de aquellas entre 10°C-30°C que permiten el mismo; choques térmicos que pueden enmascarar el efecto real de unas determinadas temperaturas sobre el ulterior desarrollo de los huevos en el

rango térmico óptimo.

A pesar de la dificultad de determinar la acción de los cambios térmicos sobre la supervivencia y desarrollo de los huevos de *E. hepatica*, al ser inseparable la influencia que ejerce la temperatura "per se" de las variaciones de la misma, existen algunos estudios que demuestran que los cambios térmicos, incluso dentro del rango de temperaturas óptimas, proporcionan modelos de desarrollo diferentes a los apreciados a temperaturas constantes. Puede realizarse una estimación de la duración del desarrollo a temperaturas variables por medio de simples ecuaciones, derivadas de las obtenidas para temperaturas constantes y en las que se considera la fracción del día en que la temperatura es inhibitoria para el desarrollo (Hopa Cawdery y col., 1978), obteniéndose un modelo matemático en el que, utilizando las constantes calculadas a partir de los datos de Ollerenshaw (1971a), la estimación del tiempo de desarrollo del huevo es bastante precisa y diferente de la hallada para temperaturas constantes.

Claros ejemplos de la influencia de los cambios térmicos sobre el desarrollo del huevo son los resultados que, sobre los tiempos de embrionación, se obtienen en trabajos de campo -sobre los que realizaremos un amplio comentario en párrafos sucesivos al constituir uno de los principales objetivos de nuestro trabajo-, y el estímulo aparente que provocan los cambios térmicos en la eclosión de los miracidios, aspecto del que también realizaremos un breve comentario más adelante.

Los primeros trabajos de campo en los que se demuestra la importancia de la temperatura en el desarrollo de los huevos de *E. hepatica* son los realizados por Thomas en 1883 y por Ross & McKay en 1929, mencionados por diversos autores, en los que aprecian que a temperaturas medias ambientales por debajo de 10°C no existe desarrollo. Con posterioridad, Ollerenshaw

(1959) y Rowcliffe & Ollerenshaw (1960), observan que las temperaturas ambientales que se presentan en Gran Bretaña sólo son favorables para el desarrollo de los huevos entre los meses de mayo a octubre.

Los periodos más cortos de embrionación se producen durante junio, julio y agosto (3 semanas), siendo el tiempo necesario algo mayor durante los meses de mayo y de septiembre. La eclosión del huevo tiene lugar, bajo las condiciones climáticas de Gran Bretaña, entre los meses de junio a octubre. Los huevos eliminados por el hospedador definitivo a partir de la mitad de septiembre no llegan a eclosionar durante ese mismo año, aunque se liberan miracidios en octubre procedentes de aquellos huevos que iniciaron el desarrollo en el mes de agosto (Ollerenshaw, 1970a).

Los huevos eliminados al medio ambiente durante el otoño y el invierno, meses en los que la temperatura no supera los 10°C, se mantienen viables pero no llegan a eclosionar hasta finales de abril-comienzos de mayo (durante tres semanas aproximadamente) los procedentes del otoño, y en la primera-segunda semana de junio los del invierno. Sin embargo, afirman estos autores británicos que, de los dos factores que condicionan el desarrollo del huevo (temperatura y humedad), es la temperatura el menos crítico en Gran Bretaña por tener esta un efecto constante de unos años para otros.

En Holanda, Over (1971) observa en trabajos de campo que, al igual que ocurre en Gran Bretaña (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960), el desarrollo del huevo es únicamente posible durante la primavera y verano, siendo también más corto el tiempo de eclosión en junio, julio y agosto. Serían los huevos hibernantes los primeros en producir miracidios; sin embargo, en su opinión, los huevos eliminados entre octubre-marzo tienen escasas posibilidades de sobrevivir, debido al efecto

perjudicial de las heladas. Con posterioridad, observaría que la capacidad de los huevos de sobrevivir al invierno es grande (más del 80-90% tras 16 semanas) pero que los huevos excretados de enero a mayo no llegan a producir miracidios hasta bien entrado junio (Over & Dijkstra, 1975).

Según Ollerenshaw (1973), en otros países europeos como Italia y, en general, en los mediterráneos, existe una gran diversidad climática y, frente a regiones montañosas del norte con bajas temperaturas que inhiben el desarrollo del huevo durante gran parte del año, existen áreas meridionales en las que éste es posible durante todo el año. Entre estos dos extremos se encuentran zonas donde las temperaturas limitan el desarrollo al periodo comprendido entre abril-octubre o marzo-noviembre. Para países del noroeste de Europa, Ollerenshaw (1974), sitúa el periodo de inhibición del desarrollo entre los meses de noviembre-abril.

En España, Simón Vicente & Garmendía (1974) y Simón Vicente & Ramajo Martín (1983) en la provincia de Salamanca, indican que el periodo favorable para el desarrollo del huevo se situaría entre abril y octubre. Díez-Baños & Rojo-Vázquez (1976), por extrapolación de sus resultados a temperaturas de laboratorio a las condiciones climáticas que presenta la provincia de León, consideran que solamente sería posible la embrionación de los huevos de F.hepatica entre los meses de marzo a octubre, aunque en julio y agosto sólo en años muy húmedos, y que de noviembre a marzo no es posible su supervivencia.

En países de otras latitudes también se han realizado estudios de campo sobre el desarrollo de los estados larvarios de F.hepatica, sobre los que no nos extenderemos en comentarios por presentar una climatología muy diferente a la de España o Europa en general. Solamente indicaremos que en un

área endémica de Australia, Boray (1969), estudia el desarrollo del huevo durante un periodo de 18 meses, observando que, en el invierno el tiempo necesario para que se complete es de 90-100 días (a temperaturas medias de 5°C con un rango de 1-11°C) y que la supervivencia de los mismos a estas temperaturas es muy elevada (60-90%). El tiempo más corto de desarrollo durante el verano es de 21 días a temperaturas medias de 15°C (rango de 10-25°C). Por otra parte, Craig Hoover y col. (1984) consideran que en el sur de Idaho el modelo de transmisión de la fasciolosis es similar al indicado para zonas europeas de condiciones climáticas similares, mientras que en las zonas de la Costa del Golfo, éste se desvía totalmente.

Sobre las posibilidades de supervivencia de los huevos durante los meses fríos -hibernación- existen ciertas contradicciones. Mientras algunos autores consideran que la contribución de los huevos hibernantes a la contaminación de los pastos con metacercarias no es significativa (Ollerenshaw, 1959; Ross, 1970; Over, 1971), otros piensan que el "overwintering" de los huevos ha sido subestimado en la epizootiología de la fasciolosis (Urquart y col., 1970; Hope Cawdery, 1975; Over & Dijkstra, 1975; Shaka & Nansen, 1979).

Así, Over (1971) indica que las posibilidades de supervivencia de los huevos son escasas en las condiciones climáticas de Holanda y, posiblemente, en la mayoría de los países de Europa, igual que comprobaran Ollerenshaw (1959) para Inglaterra y Ross (1970) para Irlanda del norte. Esta misma opinión es compartida por Díez Baños & Rojo Vázquez (1976) en España, concretamente, para la provincia de León. Sin embargo, en 1975, Over & Dijkstra, tras realizar experiencias más completas en Holanda, consideran que cuando en ese país se han observado infestaciones del hospedador definitivo en la primera mitad del verano, tienen que ser

responsables los huevos que han sobrevivido al invierno y no aquellos que son liberados al comienzo de la estación de pastoreo (primavera). Datos parecidos se obtienen en Dinamarca (Nansen & Shaka, 1975; Shaka & Nassen, 1979), en Escocia (Urquhart y col., 1970) y en el oeste de Irlanda (Hope Cawdery, 1975).

Así pues, la contribución de los huevos que contaminan los pastos durante las épocas frías a las infestaciones del hospedador definitivo no está totalmente determinada, lo que algunos autores atribuyen a la dificultad de conocer los microhábitats del molusco y a la gran diversidad de condiciones climáticas a que pueden estar sometidos. Es posible que los factores más importantes que determinan la supervivencia y posterior evolución de éstos no estén relacionados tanto con las bajas temperaturas como con la humedad u otros factores aún por determinar.

Un claro ejemplo de la influencia de otros factores (además de la temperatura por debajo de 10°C) sobre la supervivencia del huevo, está en la imposibilidad de poder aplicar un modelo matemático para el cálculo de la supervivencia a diferentes tiempos de exposición a bajas temperaturas (30-60 días). Así, la ya citada fórmula desarrollada por Hope Cawdery y col. (1978), que permitiría el cálculo de unas constantes de supervivencia para cada temperatura y duración de la exposición ensayada en trabajos de laboratorio por Al-Habbib, da valores de supervivencia para 30 días de exposición menores que para 60 días, al contrario de lo que sucede en el trabajo experimental, y que -en opinión de estos autores- es una clara evidencia de que influyen otros factores, además de la temperatura.

1.2.1.b.- HUMEDAD.

La influencia de la humedad en el desarrollo y supervivencia de los huevos de F. hepatica es conocida ya desde los primeros trabajos sobre la biología del trematodo. Así, Thomas en 1883, ya indicó que los huevos que son eliminados en terrenos permanentemente húmedos convierten a éstos en pastizales muy peligrosos para el ganado durante todo el año. Para su supervivencia, el huevo necesita de una película acuosa que lo recubra y no su completa inmersión en agua (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960). La desecación, por el contrario, provoca la destrucción del huevo en 10 minutos (Al-Habbib, 1974 en Al-Habbib & Grainger, 1983).

Por otra parte, los huevos incluidos en las heces, aun en condiciones óptimas de humedad y temperatura para el desarrollo, no llegan a eclosionar; sólo de forma esporádica se ha observado algún huevo embrionado (Ollerenshaw, 1959, Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960).

En condiciones de campo, los huevos incluidos en la masa fecal mantienen su viabilidad durante periodos variables (desde pocas semanas a varios meses), en dependencia del grado de humedad de las mismas. Cabe suponer que, durante los meses en que las temperaturas son inhibitorias para el desarrollo, la influencia de la humedad sea crítica, siendo ésta -y no la temperatura de los meses invernales- la que determinará las posibilidades de supervivencia y ulterior desarrollo de los huevos.

En opinión de Rowcliffe & Ollerenshaw (1960), durante el periodo de temperaturas inhibitorias para el desarrollo en Inglaterra (noviembre-abril), meses con elevada humedad, existirá un reservorio de huevos viables capaces de embrionar y eclosionar a finales de la primavera-comienzos del verano.

En la práctica, sin embargo, son pocas las posibilidades de supervivencia pues, por una parte, se producirá una liberación gradual por efecto de arrastre de la materia fecal por las lluvias y los depredadores, quedando los huevos expuestos a la desecación y, por otra, los huevos que permanezcan incluidos en las heces quedarán atrapados en ellas por la gruesa cubierta endurecida que se forma en su superficie durante el tiempo seco ("cracking").

El requerimiento de humedad, no sólo por parte del huevo sino también por otros estadios del ciclo biológico de *F. hepatica*, es el que hace que los modelos de transmisión de la fasciolosis difieran sustancialmente de unas áreas a otras y de unos años a otros. Por lo que, basados en la conjunción de humedad y temperatura, se han desarrollado diferentes modelos de predicción de riesgo, con diferentes connotaciones en dependencia de la climatología de cada país, que permiten tomar las medidas oportunas de control. Cabe citar entre ellos, el "Mt" de Ollerenshaw & Rowlands (1959) en Inglaterra, el "Wet-day" de Ross (1970) en Irlanda del Norte y el "T.W.B." de Malone y col. (1984/85) en Louisiana, basados en el grado de humedad, así como los modelos térmicos de Hope Cawdery y col. (1978) y los modelos mixtos ("A.R.I.M.A.") de Goodall y col. (1989) en Irlanda del Norte, que no analizaremos, por no ser la predicción matemática un objetivo de nuestro trabajo.

1.2.1.c.- INTENSIDAD DE LUZ

Existen pocas referencias sobre la influencia de la luz en el desarrollo de los huevos de *F. hepatica*; no así sobre la eclosión del miracidio. Sin embargo, son varios los autores que en sus experiencias realizan la incubación en total oscuridad, previniendo el posible efecto negativo de determinadas radiaciones. La radiación solar parece tener un

efecto negativo sobre la supervivencia y desarrollo de los huevos, pero no está clara su influencia cuando los rayos no inciden de forma directa. En las experiencias realizadas por Rowcliffe & Ollerenshaw (1960), los cultivos expuestos a la luz mostraron una mortalidad mayor que los mantenidos en obscuridad, lo que estos autores atribuyen al elevado crecimiento de algas. Por su parte, Over (1971) no observó ningún desarrollo, a temperatura ambiente, en los cultivos expuestos a la acción constante de la luz. A este respecto, los resultados de Vázquez Gómez y col. (1985) muestran que los huevos en total obscuridad tienen un desarrollo más rápido que los expuestos ininterrumpidamente a la luz y valores intermedios los sometidos a un fotoperiodo de 10 horas oscuridad/14 horas luz.

1.2.1.d.- TENSION DE OXIGENO

En el interior de las heces, pese a no existir desarrollo, los huevos sobreviven el doble de tiempo en condiciones aerobias que en anaerobiosis. Liberados de éstas a un medio acuoso, las variaciones en la tensión de oxígeno no modifican la velocidad de desarrollo (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960). Parece, por otra parte, que las tensiones de oxígeno elevadas son desfavorables para la embrionación (en Cordero del Campillo, 1966).

El grado de aireación ha sido considerado un factor positivo en la velocidad de eclosión de los miracidios aunque su efecto no es claro. En opinión de Gold & Goldberg (1976), en estas investigaciones se ha considerado el incremento en la oxigenación "versus" enfriamiento, por lo que en realidad los resultados podrían responder a la acción del descenso de la temperatura más que al aumento de tensión de oxígeno.

1.2.1.e.- CONCENTRACION DE HIDROGENO LIBRE (pH).

El rango de pH al que se produce desarrollo de los huevos de F. hepatica es muy amplio (4.2-9.0); parece, sin embargo, que la velocidad de embrionación es mayor a pH ácido que básico. Basándose en que el hospedador intermediario -Lymnaea truncatula- suele utilizar hábitats neutros o tendentes a la alcalinidad, Vázquez Gómez y col. (1985) consideran que, tanto sus resultados como los de Rowcliffe & Ollerenshaw (1960), pueden estar influidos por la composición química del medio (concentración iónica) y no por el pH que con ella se pretendía simular. Sin embargo, el hospedador intermediario se ha encontrado en hábitats que presentan un amplio rango de pH y así, mientras que en Bélgica, Francia y Holanda son neutros o tendentes a la alcalinidad (Moens, 1981), en la Península Ibérica son desde ligeramente ácidos a neutros (Simón Vicente, 1968; Gracío, 1985). Es posible, pues, que esta aparente tolerancia al pH que presenta L. truncatula repercute también en la que puede presentar el parásito en su desarrollo.

1.2.1.f.- OTROS FACTORES

Se ha considerado que, bajo las mismas condiciones de humedad relativa a saturación, los suelos arenosos retardan el desarrollo (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960). En cuanto a la composición química del terreno o dilución de determinadas sustancias en el agua, sólo existen referencias sobre la concentración de sulfato cúprico, que a 1:100 parece permitir un normal desarrollo del huevo pero no la eclosión del miracidio.

1.2.2.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ECLOSION DEL MIRACIDIO

Una vez el miracidio se ha desarrollado totalmente, en su liberación de la cáscara del huevo parecen influir determinados factores, de los que algunos están parcialmente determinados y otros, por el contrario, quedan por demostrar. Roberts (1950), consideró que el único factor externo que estimula la eclosión del miracidio es la luz y, más concretamente, en las longitudes de onda del violeta y azul; esta misma consideración es realizada posteriormente por otros autores (Rowan, 1956; Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960; Wilson, 1968). Sin embargo, Eurelec (1960) y Gold & Goldberg (1976) indican que es el descenso de temperatura (28°C a 20°C), y no la iluminación, el principal factor que desencadena la eclosión. Estos últimos autores observan, además, que los porcentajes de eclosión son mayores cuando los huevos son sometidos a iluminación, aunque la intensidad de luz parece no tener efecto alguno.

En opinión de Rowan (1956), la eclosión es dependiente de la liberación de una enzima proteolítica, activada en presencia de luz, que debilita la unión del opérculo, lo que, unido a la hipertonia del huevo y a los movimientos musculares del miracidio, permite su liberación. Wilson (1968) considera, sin embargo, que son los movimientos del miracidio, estimulados por la luz, sin descartar el efecto de la temperatura, los que alteran la permeabilidad de la almohadilla protectora, que se debilita y provoca en su expansión la liberación del miracidio.

Se han considerado también como factores desencadenantes de la eclosión, las vibraciones mecánicas (Wilson, 1968; Gold & Goldberg, 1976), concentraciones de 2-10 mmol/l de CO₂ y el paso de luz a obscuridad (en Smyth & Halton, 1983).

Por otra parte, Gold & Goldberg (1976) observan que la velocidad de eclosión aumenta a temperaturas de incubación de 20°C, a las que el porcentaje de infestación por los miracidios también es mayor (Díez y Díez, 1981). Marcadamente inferior a la óptima para su desarrollo, está más en consonancia con las temperaturas adecuadas para la actividad del hospedador intermediario, como veremos más adelante.

1.2.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA Y LONGEVIDAD DEL MIRACIDIO.

El miracidio, primer estadio larvario de transmisión, debe desplazarse en el agua hasta poder penetrar en el hospedador intermediario. Su longevidad no excede de, aproximadamente, 24 horas, aunque su velocidad natatoria es de 1 mm/seg, por lo que la distancia que puede llegar a recorrer en su corta vida es de 50 m a temperaturas entre 10-15°C (en Smith & Grenfell, 1984).

La temperatura del agua tiene una marcada influencia sobre la longevidad del miracidio, pasando de 19 h a 6°C a solamente 5h a 25°C; no ocurre así con el pH, que no parece modificar su supervivencia en el rango 6.0-8.0 (Smith & Grenfell, 1984).

Basándose en los datos aportados por Al-Habbib, Gettinby, en 1974 (en Hope Cawdery y col., 1978), desarrolla una fórmula que permite predecir con gran exactitud la longevidad del miracidio a diferentes temperaturas del agua (longevidad en horas = $\exp (-0.069 T + 3.8)$).

En este rango de temperaturas (6-25°C), las curvas de supervivencia de los miracidios se ajustan a los valores predecibles por la aplicación de la ecuación de Gompertz. Ello implica, pues, que el comportamiento de esta fase larvaria

está condicionado por su gasto energético (agotamiento de las reservas de glucógeno) y sigue un modelo de supervivencia, dependiente de la edad, similar al descrito para otros trematodos Digenea (Smith & Grenfell, 1984).

Dentro del intervalo de temperaturas a las que el molusco es activo (10-25°C), el incremento térmico produce un doble efecto: aumenta la velocidad natatoria del miracidio, por lo que las posibilidades de contacto parásito-hospedador serían mayores, y acelera el agotamiento de sus reservas energéticas, acortándose por tanto su longevidad.

Christensen y col. (1976a) sitúan la temperatura mínima para que se produzca la infestación del hospedador intermediario en 5-6°C y comprueban el acortamiento del periodo en que el miracidio es infestante a medida que aumenta la temperatura. Por otra parte, la preincubación de los huevos a 4°C durante 30 días, o a 15°C 4 días, deteriora notablemente el poder infestante de los miracidios que llegan a eclosionar (Díez y Díez, 1981).

1.2.4.- RELACION F.hepatica/HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.

En el contacto miracidio-hospedador intermediario tiene una cierta influencia la secreción, por parte de este último, de sustancias compuestas por ciertos ácidos grasos que provocan en el miracidio estímulos quimiotácticos a una distancia de hasta 15 cm (Christensen y col., 1976b). Estas sustancias parecen estar presentes en el mucus del molusco y en los huevos por él depositados. Como la distribución de los hábitats del hospedador intermediario es muy aleatoria y su capacidad de desplazamiento escasa, las posibilidades de infestación se reducen bastante. Por otra parte, para que la

infestación tenga lugar es necesario también que el nivel del agua no sea inferior a 1-1 mm (Wilson & Taylor, 1978).

El éxito de la infestación también está relacionado directamente con la densidad de miracidios y de la población de hospedadoras intermediarias (Anderson, 1978). Se desconoce cuál es la densidad mínima de limneas necesaria para evitar el desperdicio de miracidios, aunque parece que, a partir de un cierto nivel, el aumento de población no va seguido de un incremento de las infestaciones. Un trabajo de interés es el realizado por Christensen y col., (1976b) que en ejemplares de *Limnaea stagnalis* infestados por *E. hepatica* observan el mantenimiento del poder de atracción sobre los miracidios y de un cierto grado de receptividad a la infestación, lo que, considerando el carácter letivo que sobre el molusco tiene un proceso de parasitación, se traduce en una merma del potencial reproductivo del parásito, al no distinguir limneas infestadas de las que no lo están.

Se ha indicado que la relación que existe entre la densidad de miracidios y la tasa de infestación (número de miracidios/caracol/unidad de tiempo) sigue un modelo de distribución de Poisson (Wilson & Taylor, 1978). La validez de este modelo, sin embargo, fue rechazada por Anderson (1978), al demostrar, empíricamente, que el aumento del número de miracidios no elevaba la tasa de infestación, lo cual, descartando la influencia de las variables térmicas y de la verticalidad dependiente de la edad, fue atribuido por este autor a la influencia de la heterogeneidad existente dentro de poblaciones de moluscos hipotéticamente homogéneas. De este modo, la distribución de las infestaciones en un hábitat deja de ser aleatoria para sufrir una dispersión -dependiente del grado de heterogeneidad- que sigue un modelo de distribución "binomial-negativa", como, posteriormente, comprobara en un extenso trabajo Smith (1987).

La penetración del miracidio en el molusco no parece producirse siempre por una zona determinada (Escudero Díez, 1970). Es un proceso activo en el que intervienen factores mecánicos y químicos. A medida que se produce la penetración tiene lugar la transformación en esporocisto, que, en opinión de Taylor (1965), se dirige al hepatopáncreas donde, y sólo a partir de entonces, tendrá lugar el desarrollo de sus células germinales, originándose un número determinado de condensaciones celulares precursoras de la siguiente fase de desarrollo: las redias. Esta opinión no es compartida por Escudero Díez (1970), quien considera que los esporocistos evolucionan "in situ" y que son las redias, una vez roto el saco esporocístico y liberadas, las que emigran hacia el hepatopáncreas.

1.2.4.a.- RECEPTIVIDAD DEL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.

Son abundantes los trabajos que se han realizado sobre las especies de moluscos pulmonados que pudieran ser hospedadores intermediarios adecuados de Fasciola hepatica; sin embargo, en esta revisión solamente haremos referencia a aquellos aspectos de interés general que puedan tener relación con los objetivos de nuestro trabajo y entre los que no hemos contemplado la receptividad del hospedador intermediario, al ser Lymnaea truncatula la especie hospedadora más importante en España.

Por otra parte, de los estudios realizados hasta ahora se deduce que esta especie es el hospedador intermediario principal y que, solamente en ausencia de L. truncatula, otros limneidos han podido llegar a actuar como tal (Beray 1969). A ello contribuye la gran capacidad de adaptación del parásito, proceso parcialmente dependiente del grado de tolerancia de los adultos de la especie infestada. En este sentido, la única

especie que es parasitada a cualquier edad es *L. truncatula*; resistencia edad-dependiente intermedia presentan especies como *L. lamellosa*, *L. alba*, *L. columella* y *L. salmonea*. Cuando la especie ofrece una elevada resistencia -edad dependiente-, como ocurre con *L. stercoraria*, *L. hexagra* (parásita), *L. palustris* o *L. angustata*, la adaptación ha sido posible, pero de una forma más lenta. Según esto, el parásito podría haberse adaptado con relativa rapidez a las especies norteamericanas (*L. lamellosa* y *L. columella*), australasiática (*L. tomentosa*) y del océano Pacífico (*L. alba*).

Existen importantes trabajos de campo que demuestran la infestación por *L. hepatica* de especies no habituales, y detalladas listas de las que actúan en la transmisión en las áreas en que *L. truncatula* no existe (Australia, América y algunas islas del Pacífico). Son muchos los ensayos de laboratorio en los que se demuestra la capacidad de otras especies para actuar como hospedadores intermediarios de reserva; sin embargo, el papel de éstas en la transmisión de la fasciolosis dependerá de la presencia o no de *L. truncatula*. Así, todos los esfuerzos por encontrar eliminaciones importantes de cercarias de *L. hepatica* por otras especies, en las zonas en que habitualmente aquella está presente (Europa, Asia y África), han sido inútiles, y las infestaciones sólo se han conseguido en determinadas especies y en ejemplares de muy corta edad (Kendall, 1950; Bondar-Borosa y col., 1943; Bartha & Bondelaud, 1966; Bondelaud & Bartha, 1967; Hoge y col., 1949), observándose en todas ellas un marcado efecto lesivo y escasa proliferación del parásito, a diferencia de lo que normalmente sucede con su S.I. habitual (*L. truncatula*). La excepción parece ser *L. tomentosa*, al haberse obtenido infestación en ejemplares de cualquier edad y sin efecto patógeno aparente (Boray, 1959).

Algunas especies de limulidos tienen una alta capacidad de

atracción sobre los miracidios de F.hepatica. Sin embargo, la infestación sólo se completará en aquellas que presenten una menor reacción celular (Smith & Crombie, 1982). Es importante considerar la atracción que sobre los miracidios de F.hepatica ejercen especies como L.peregra, L.palustris y L.stagnalis. Atracción que, aun siendo mucho menor que la ejercida por L.truncatula, incidirá de forma negativa sobre el potencial reproductivo del parásito en aquellas zonas en que coexistan en un mismo hábitat (Christensen y col., 1976b), circunstancia que se da con relativa frecuencia (Simón Vicente, 1979).

Por último, cabe indicar que en la Península Ibérica existen pocos estudios sobre el hospedador intermediario de F.hepatica, aunque los existentes corroboran que, al igual que en el resto de los países europeos, es L.truncatula el hospedador intermediario natural (Sampaio Xavier y col., 1968; Simón Vicente, 1968 y 1979; Manga y col., 1987). Los intentos realizados en laboratorio por conseguir infestaciones en otros gasterópodos de agua dulce, tanto o más abundantes en la Península que L.truncatula, han sido inútiles en especies como Physa acuta (Sampaio Xavier y col., 1968) aunque no así en L.palustris, que se ha considerado la única especie capaz de actuar como hospedador intermediario ocasional en ausencia de L.truncatula (Sampaio Xavier y col., 1968; Escudero Díez, 1970; Cordero del Campillo, 1974; Díez y Díez, 1981).

1.2.4.b.-EFECTO DEL PARASITO SOBRE EL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO

En este capítulo, y aunque no haya sido motivo de estudio en nuestro trabajo, quisieramos hacer una breve reseña sobre las repercusiones del parasitismo en el hospedador intermediario, por la influencia que puede tener, aunque sea escasa, sobre la epidemiología de la fasciolosis.

Aunque Kendall (1930) considerara que *L. banatica*... "pase a proliferar abundantemente en *L. truncatula*, no sólo no produce efectos lesivos sino que estimula su crecimiento...", ha sido ampliamente demostrado que *L. banatica* provoca en su hospedador intermediario además de gigantismo, castración. Durante un periodo de 2-4 semanas postinfestación, la tasa de crecimiento es similar entre poblaciones infestadas y sin infectar (Over, 1971; Modasi, 1972; Wilson & Denison, 1980). A partir de ese momento, y coincidiendo con la supresión en la producción de huevos, a 1 semana después de observarse ésta (Ximenes Albarrán, 1979), la población infestada presenta un gran incremento del crecimiento, que se traduce en una mayor longitud de la concha y mayor peso corporal. Este fenómeno, conocido como gigantismo, se detiene con el comienzo de la eliminación de cercarias (Modasi, 1972) y se cree pudiera ser debido a la liberación, por las redias, de un factor estimulante del crecimiento o consecuencia de la castración.

Simultáneamente a la aceleración del crecimiento, se aprecia alteración del hepatopáncreas y la atrofia del tejido gonadal (Modasi, 1972) o la destrucción del mismo (Over, 1971; Wilson & Denison, 1980). Se ha sugerido que la castración no es debida tanto a la destrucción mecánica del tejido como a la liberación metabólica o liberación, por las redias, de alguna sustancia con efecto esterilizante. El gigantismo y la castración que sufre el hospedador intermediario, parecen ser particularmente beneficiosos para el parásito, que producirá mayor cantidad de cercarias en los caracoles "grandes"; fenómeno observado en la relación parásito-hospedador de gran diversidad de especies (Barnard, 1980).

1.2.5.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL PARASITO EN EL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.

La duración del desarrollo larvario intramolusco es muy variable y parece estar relacionada con el potencial reproductor del parásito y con los factores ambientales. En condiciones controladas de laboratorio y a temperatura óptima, la duración del ciclo intramolusco es de aproximadamente 30-40 días en Lymanaea truncatula y L. cillula (Escudero Díez, 1970; Kamiharato y col., 1986; Itagaki y col., 1988). Las primeras redias se observan en el hepatopáncreas a los 15-20 días postinfestación y existen cercarias ya maduras a los 30 días.

El número de redias que se originan de un esporocisto es muy variable (desde 5 hasta 40) y, en gran parte, condicionado por el tamaño del caracol en el momento de la infestación; la relación es directa hasta un tamaño medio de los moluscos de unos 11 mm; a partir esa medida, el número de redias que se originan se hace constante (Rondelaud & Bartha, 1987). No parece serlo tanto la cantidad de cercarias que se generan por redia (16 a 28), aunque sí el número de éstas que se originan por la penetración de un miracidio y que oscila entre 400 a 1000 si las circunstancias lo propician (Kendall, 1949a).

1.2.5.a.- TEMPERATURA

En la biología de F. hepatica, la temperatura es uno de los factores limitantes más importante y, al igual que sucede con la embrionación del huevo, el desarrollo en el hospedador intermediario depende de ésta, al ejercer una notable influencia sobre el molusco, la flora de la que se alimenta y sobre el parásito mismo.

El rango térmico óptimo para el desarrollo de *L. truncatula* y la flora de su entorno es de 18-21°C. Temperaturas superiores provocan un notable deterioro en el molusco que, por el contrario, es capaz de permanecer activo a muy bajas temperaturas (1-5°C) (Kendall, 1951; Nedasi, 1976).

Las temperaturas a las que es posible el desarrollo del parásito en el hospedador intermediario se encuentran en el mismo rango que el de desarrollo para el huevo. Concretamente en *L. truncatula*, éste se produce a temperaturas entre 10-38°C; sin embargo, en *L. taniantha* el rango térmico de desarrollo larvario se amplía hasta 35°C (Boray, 1963; Kendall, 1965). Estas diferencias, se cree, son debidas a la mayor resistencia de esta especie de limnéido a las altas temperaturas de las zonas tropicales. Señala sin embargo Boray (1964 cit. por Owen, 1989), que el desarrollo larvario a temperaturas tan elevadas compromete la viabilidad de las cercarias, las cuales requieren, para ser infestantes, que el desarrollo intramolusco se haya producido a temperaturas que no excedan de 21°C, como ya habían indicado otros autores (en Cardozo, 1966). Por otra parte, y a pesar de esta elevada tolerancia térmica, son las altas temperaturas que se presentan en zonas donde las mínimas raramente bajan de 10°C, las que limitan la presencia del molusco y, por tanto, del parásito (Boray, 1963; Owen, 1989).

En trabajos de laboratorio a temperaturas constantes, diversos autores, han comprobado que, dentro del rango térmico favorable, existe un acortamiento del tiempo de desarrollo larvario intramolusco al aumentar la temperatura, tal como se aprecia para *L. truncatula* en el Cuadro siguiente:

Tª cte	TIEMPO PARA DESARROLLO LARVARIO INTRAMOLUSCO (hasta observación de las primeras cercarias)			
10°C	No			No
15°C		82 días		70 días
16°C			56 días	
18°C		53 días		
20°C		40 días	39 días	37 días
25°C		34 días	30 días	
26°C		25 días		27 días
27°C	21 días	22 días		
30°C				23 días
AUTOR	Kendall (1965)	Ollerenshaw (1971a)	Nica & Wilson (1974)	Al-Habbib (1974)

Cabe destacar, entre estos trabajos, el de Nica & Wilson (1974), quienes observaron además que el peso máximo que alcanzan las rädias al llegar a su madurez no varia con la temperatura, pero sí el tiempo requerido para ello (velocidad de desarrollo).

A partir de los datos de Ollerenshaw (1971a) y de Al-Habbib (1974) (indicados en el Cuadro), Gettinby (cit. por Hope Cawdery y col., 1978) ha desarrollado modelos matemáticos de cálculo del tiempo de desarrollo estimado a una temperatura constante dada. El coeficiente de correlación entre estimados y observados es muy elevado (aproximadamente -0.99) cuando se aplica la fórmula logarítmica: $\ln D_T = b_1 T + b_0$ con unas constantes $b_1 = -0.10611$ ó -0.0747 y $b_0 = 5.8963$ ó 5.9437 (según se utilicen los datos de Ollerenshaw o de Al-Habbib). A partir de la misma se puede hacer una estimación del tiempo de desarrollo a temperaturas variables, pero ahora en la



forma $1/D_T$, y teniendo en cuenta la fracción del día en que actúan unas u otras y si éstas son o no inhibitorias (Settinby, en Hope Cawdery y col., 1978). Este modelo, sin embargo, parece subestimar el tiempo real de desarrollo (tiempos calculados más cortos que los observados) lo que Settinby atribuye a las variaciones que existen en la formación de las cercarias (sobre todo en el tiempo que transcurre desde ésta hasta que emergen del hospedador que, según los datos de Al-Mabbib, es de 45 días a 15°C o 20 días a 20°C) y a la dificultad de realizar mediciones térmicas precisas en el microhábitat del caracol. Por otra parte, la elevada correlación existente entre los valores calculados por aplicación de estas fórmulas y los datos de tiempo de desarrollo, obtenidos en trabajos de campo y de laboratorio, indican que el principal factor que afecta a la velocidad de desarrollo de *F. hepatica* en el molusco es la temperatura (Nice & Wilson, 1974; Hope Cawdery y col., 1978).

La temperatura mínima necesaria para que *F. hepatica* complete el desarrollo en el molusco se sitúa, como hemos indicado anteriormente, en 10°C, muy por encima de las bajas temperaturas a que se mantiene activo el hospedador intermediario (Kendall & McCullough, 1951; Boray, 1961; Wilkerson, 1971a; Al-Mabbib & Grainger, 1983). Por debajo de 10°C el desarrollo en el molusco se detiene, pero el parásito puede permanecer en latencia durante prolongados periodos de tiempo (al menos 100 días), aunque para su reactivación la temperatura debe alcanzar los 20°C.

Estas observaciones, realizadas por Boray (1961) muestran que la capacidad de supervivencia a bajas temperaturas excede del tiempo necesario para superar los inviernos de Gran Bretaña y países centroeuropeos, y le sirven al autor para considerar las posibilidades de supervivencia del parásito en regiones muy frías del norte de Europa, en las que el

desarrollo larvario intramolusco podría prolongarse hasta 2-3 años. Sin embargo, con posterioridad se ha apreciado que no existe fasciolosis en regiones del norte, como Islandia y Escandinavia, aun existiendo hospedadores intermedios y definitivos potenciales (Ollerenshaw, 1971b; Leimbacher, 1978), lo que demuestra que a tan bajas temperaturas no es posible que se complete el ciclo biológico de F.hepatica.

El estado de latencia del desarrollo de F.hepatica en el hospedador intermedio ha sido explicado por la hipótesis que, ya en 1886, planteó Leuckart (en Kendall, 1965) sobre la producción, por parte de las redias, bien directamente de cercarias o bien de redias hijas, en dependencia de la temperatura de desarrollo. Según este autor, la producción de redias hijas, tendría lugar ante el descenso térmico y, por tanto, se presentaría en las infestaciones de otoño del molusco. Efecto posteriormente demostrado por Kendall (1965) y justificado como mecanismo defensivo hibernante del parásito. En esta misma línea, Al-Habbib (1974) (en Al Habbib & Grainger, 1983) demuestra que, en el rango térmico de 15-25°C, la producción de cercarias está en relación inversa a la temperatura, lo que atribuye a una menor producción de redias hijas con el aumento de la temperatura que se hace nula por encima de 25°C.

Los resultados de estos autores contrastan con la hipótesis que, en 1883, propuso Thomas (cit. por Kendall, 1965), para el cual, la producción de redias hijas tendría lugar en los meses cálidos, siendo durante el invierno cuando se formarían directamente las cercarias. En cualquier caso, no parece tan claro que la formación de redias hijas esté relacionada exclusivamente con la acción de las bajas temperaturas, como demuestra su aparición, o su presencia en mayor cantidad, cuando el molusco es sometido a cambios térmicos -tanto por aumento de temperatura como por descenso- o a inanición:

situaciones de stress para el molusco que inducirían dicho mecanismo defensivo en el parásito, si bien, en menor medida según avanza el periodo post-infestación (Wilson & Draskau, 1976; Ruedelaud & Barthe, 1978a).

En condiciones de campo, los trabajos de Ollerenshaw (1959, 1971a) muestran que en el sur y sureste de Inglaterra las variaciones térmicas anuales originan un desarrollo larvario intramucoso de corta duración, procedente de las infestaciones "de verano", y otro mucho más prolongado, consecuencia de las infestaciones "hibernantes", siendo el tiempo mínimo de desarrollo, en las condiciones térmicas estivales, de 8 semanas. Hasta la primera mitad del mes de agosto, las infestaciones en el caracol llegan a término durante el periodo estival, mientras que en las infestaciones posteriores, el desarrollo del parásito se detiene (hibernación o letargo), para reanudarse a finales de la primavera siguiente. De esta forma, el periodo de eliminación de cercarias se extiende desde finales de julio hasta finales de octubre por infestación del hospedador intermediario durante la primera mitad del verano y, en el año siguiente, desde finales de mayo hasta julio, como consecuencia de las infestaciones del caracol que se produjeron a partir de la segunda mitad del mes de agosto.

Como comprobara Ollerenshaw (1966, 1967, 1971b), en estudios realizados en el resto de Inglaterra y en Gales, las variaciones respecto a lo indicado para el sur y sureste no son muy importantes y, pueda considerarse, son inherentes a las diferencias térmicas que se producen durante las épocas frías entre las diferentes áreas geográficas.

De estas dos infestaciones del caracol es, normalmente, la de verano la que adquiere una mayor importancia, en la transmisión de la enfermedad al hospedador definitivo, por

causas que no sólo dependen del tiempo de desarrollo en el molusco, sino también de la tasa de mortalidad de éste (mayor mortalidad de caracoles infestados durante el invierno), velocidad e intensidad de desarrollo del huevo (ambas superiores durante el verano) y de la resistencia de las metacercarias (mayor durante la época fría) (Ollerenshaw, 1970a). En general, según este autor, la importancia de la contaminación con metacercarias procedentes de la infestación de verano del caracol dependerá de la climatología existente entre mayo y octubre y, en la de invierno, de las condiciones que existan en los meses de agosto, septiembre y octubre de un año y mayo y junio del siguiente.

Respecto a la densidad de población parasitada, este autor indica que en Gran Bretaña, entre abril y junio la población de limneas infestadas es muy baja; a partir de julio aumenta, alcanzando un máximo en septiembre y comenzando el descenso en octubre por mortalidad de las limneas infestadas. De esta forma, y pese a la elevada mortalidad de limneas durante el periodo frío, la población parasitada en el invierno será siempre mayor que en la primavera del año siguiente, alcanzando siempre la máxima proporción al final del verano.

La importancia que se atribuye a uno u otro tipo de infestación del caracol en otras zonas de inviernos moderados y veranos frescos es muy dispar. Así, Ollerenshaw (1959) y Ollerenshaw & Smith (1969) para el norte de Escocia y Hope Cawdery (1975) para el oeste de Irlanda, consideran que en junio, se produce en estas zonas una importante emisión de cercarias que sólo pueda proceder de la denominada infestación "hibernante" del caracol, dado que las primeras eclosiones de huevos de F. hepatica tienen lugar por esa época o con posterioridad. Sin embargo, Ross (1970), Armour y col. (1970), Urquhart y col. (1970) y Bruce y col. (1973) afirman que, en el norte de Irlanda, oeste de Escocia y regiones

climatológicamente similares, el "overwintering" en el caracol es irrelevante en la epizootiología de la fasciolosis y que la contaminación de los pastos se inicia en la primera mitad de agosto (algunos años ya en julio), siendo responsables de infestaciones más tempranas los huevos que han sobrevivido al invierno.

La consideración de estos últimos autores es compartida por Over & Dijkstra (1975) y Shaka & Hansen (1979) para otros países europeos de similar latitud, concretamente para Holanda y Dinamarca, donde las temperaturas estivales permiten completar el desarrollo larvario intramolusco en 6-8 semanas pudiendo iniciarse la eliminación de cercarias ya a finales de julio (las esoluciones de miracidios más tempranas se producen ya antes de finales de mayo). Por otra parte, también en latitudes lejanas pero de similar climatología, como Nueva Zelanda, la infestación "hibernante" del caracol es considerada irrelevante por existir una elevada mortalidad de los caracoles durante el invierno y comienzos de la primavera (Harris & Charleston, 1976).

Es opinión generalizada que la importancia de la infestación "hibernante" del caracol en la epizootiología de la fasciolosis depende de la crudeza de los inviernos y del grado de humedad que se presente ese año. Así, en zonas donde suele descartarse la contaminación por metacercarias atribuida a la hibernación parasitaria intramolusco, es posible que pueda producirse en determinados años, como probaron los resultados obtenidos en 1961 y 1962 en Holanda (Over & Dijkstra, 1975), o estar ausente en zonas donde había tenido una relativa importancia en años anteriores, como sucediera en el oeste de Irlanda en 1974 (Hope Cawdery, 1975).

Es probable pues, que estas opiniones tan distintas sean debidas a una diferente estimación de los periodos de sequía

que se pudieron presentar durante las épocas estivales estudiadas, en zonas que, "a priori", deberían ser consideradas de veranos moderados y húmedos o, a la presencia de periodos más fríos de lo habitual. Puede señalarse, además, que en todos los tipos de hábitats, se observa un letargo en el desarrollo del molusco en el periodo noviembre-enero, que es más acusado y se asocia a gran mortalidad cuando las temperaturas invernales son muy bajas.

A su vez, más al sur de Europa las altas temperaturas y escasa humedad estivales imposibilitan que se produzca infestación del hospedador intermediario durante los meses de verano en determinadas áreas de Francia, Italia o Portugal (Ollerenshaw & Smith, 1969). Sin embargo, en aquellas zonas de la Europa meridional en las que se mantenga una humedad adecuada, las altas temperaturas existentes durante parte de la primavera y el verano provocarán una contaminación más prolongada e intensa de los pastos por metacercarias (Ollerenshaw, 1970b, 1971c, 1973; Leimbacher, 1978) a la vez que un acortamiento del periodo de desarrollo.

En estas zonas podrían producirse tres tipos de infestación en el hospedador intermediario, que Leimbacher (1978) denomina "infestación temprana de verano" (originada en junio, madura durante el mes siguiente), "tardía de verano" (que abarca desde agosto hasta septiembre) e "infestación hibernante" (producida en octubre pero que madura en mayo del año siguiente). Es decir, en los terrenos permanentemente húmedos de estas zonas más cálidas la contaminación de los pastos con metacercarias puede producirse de forma ininterrumpida desde mayo hasta septiembre-octubre. En estas áreas templadas -y en otras más cálidas-, en opinión de Boray (1969), aunque el parásito puede hibernar en forma de huevo o en estado larvario intramolusco, posiblemente sea la infestación hibernante en el caracol la responsable de la

fasciolosis aguda del hospedador definitivo que se produce ya a mediados de la primavera.

En España, existen datos referentes a las poblaciones de L. truncatula en la submeseta norte que indican que el periodo de actividad de este molusco está comprendido entre marzo y octubre y que el tamaño de las poblaciones está marcado por la pluviosidad anual (Cordero del Campillo y col., 1983). En la provincia de Salamanca, las primeras emisiones de cercarias, procedentes de la infestación del caracol en el otoño del año anterior y que reanudan su actividad en abril, suelen producirse en mayo-junio; algunos años ya a finales de abril (Simón Vicente, 1968; Simón Vicente & Garmendia, 1974; Simón Vicente & Ramaño Martín, 1985). Al igual que se ha indicado para algunas regiones del norte europeo, en la provincia de León y Salamanca, las emisiones de primavera provocadas por los caracoles con infestación hibernante tienen una escasa importancia, comparada con las emisiones provocadas por las infestaciones producidas desde finales de mayo (Simón Vicente & Ramaño Martín, 1983; Manga y col., 1987).

Estas infestaciones "tempranas" de verano serían responsables de la contaminación de los pastos a partir del mes de julio (en años de primavera temprana, ya en junio); sin embargo, la sequía que se produce durante el periodo estival provoca un retraso, o interrupción del desarrollo parasitario, por estivación del molusco. En estas circunstancias, la contaminación de los pastos se produce a partir de septiembre y no durante el verano como sucede en Gran Bretaña. La eliminación de cercarias que se produce a partir de septiembre es más importante que la de primavera (mayo-junio), al existir un mayor porcentaje de individuos parasitados, aunque el tamaño de las poblaciones sea menor. Así pues, en Salamanca y en León (Simón Vicente, 1968; González Lanza y col., 1989), como sugirieran Ollerenshaw & Smith (1969) para el norte de

Portugal y sur de Francia, la emisión de cercarias de F. hepatica por el caracol se produce a finales de verano-comienzos de otoño y, en menor medida, en primavera y no existirá durante el verano (al contrario de lo que sucede en países europeos más húmedos).

La dinámica de contaminación de los pastos por metacercarias, apreciada en las zonas de España estudiadas, se modifica completamente en aquellas áreas de implantación de regadío (Simón Vicente & Ramajo Martín, 1983). Como ya indicara Boray (1969) en Australia, la irrigación artificial no sólo permite el desarrollo parasitario durante todo el periodo estival, sino que el riego por inundación constituye un vehículo de dispersión de los moluscos y, por tanto, del parásito.

En áreas de España con permanente humedad (zonas de regadío del Tormes en la provincia de Salamanca y en la cuenca del río Porma en la de León) la infestación en el caracol se observa a lo largo de todo el año, apreciándose los porcentajes más elevados a finales de verano-comienzos del otoño y en febrero-marzo (Simón Vicente, 1968 y 1979; González-Lanza y col., 1989). Imprime importancia a la infestación hibernante del caracol en estas áreas, el hecho de que en los ejemplares de L. truncatula recogidos en febrero y comienzos de marzo se aprecien esporocistos y radias con cercarias en avanzado estado de desarrollo, a la vez que un importante incremento en la maduración de las cercarias en meses sucesivos.

Por último, quisieramos señalar que los estudios realizados en otros continentes también reflejan la gran influencia de la temperatura sobre el desarrollo larvario intramolusco y que los ritmos de eliminación dependen del grado de humedad, al ser ésta la que limita la actividad de los moluscos. Así, en los Estados Unidos de América, en las costas del Golfo

(Texas, Louisiana y Florida), la principal emisión de cercarias se produce desde finales del invierno (febrero) -en algunas zonas ya en diciembre- hasta finales de la primavera comienzos del verano (junio-julio) produciéndose el pico máximo de emisión durante la primavera, pudiendo existir, además, una segunda eliminación en el otoño, de poca intensidad, a cargo de las líneas que superaron el verano en estivación (Craig & Bell, 1978; Malone y col., 1984/85; Boyce & Courtney, 1990). La infestación de invierno del caracol es así más importante que la de verano, en esta área norteamericana. A juzgar por los resultados de Millan Suarez y col. (1989) sobre porcentajes de caracolas infestadas (elevados en enero, febrero, septiembre, octubre y noviembre), la emisión de cercarias en México (Estado de Guerrero), al igual que en el sur de los Estados Unidos de América, tiene mayor importancia durante la primera mitad del año. Sin embargo, en el sur de Idaho, la dinámica de emisión de cercarias se asemeja, por la rigurosidad de sus inviernos, a la observada en algunas áreas norteeuropeas (Craig Hoover y col., 1984).

En los países tropicales, las temperaturas permiten el desarrollo de *F. hepatica* en el hospedador intermediario durante todo el año y es el número de días de lluvia y el nivel de agua del suelo lo que limita la actividad del molusco y, por consiguiente, el desarrollo del parásito, como demuestran los estudios realizados en Etiopía y en São Paulo (Brasil) (Lamas y col. 1985; Anato y col., 1986).

1.3.5.2. - ~~CONDICIONES~~

Como ya se ha indicado al comentar la influencia de la temperatura en el desarrollo intramolusco de *F. hepatica*, y aun debiendo ser considerada como el principal factor que delimita el tiempo en que ésta tiene lugar, la humedad es determinante

de la dinámica de contaminación de los pastos con metacercarias, en la medida en que afecta a la actividad del hospedador intermediario. La humedad, sin embargo, tiene una influencia mucho menos crítica sobre esta fase del desarrollo que sobre el huevo, que para su supervivencia necesita, como ya indicamos en el apartado correspondiente, permanecer siempre recubierto de una película de agua.

El nivel óptimo de humedad para este molusco anfibio se alcanza cuando existe una ligera capa de agua libre sobre la superficie del suelo. Los mejores suelos son aquellos mal drenados y levemente ácidos, que permitan la existencia de un elevado nivel de humedad superficial (Ollerenshaw, 1971a). Estos hábitats suelen estar sometidos a periodos intermitentes de sequía, a los que el caracol, cuya localización habitual es la intersección del agua con la tierra, está totalmente adaptado (Kendall, 1949b y 1965). Su capacidad defensiva frente a la sequía le permitirá mantenerse bajo el fango, en estado de letargo, durante el periodo que ésta dure, interrumpiendo todo tipo de actividad destinada a la alimentación, nutrición o reproducción. En estudios de laboratorio se ha observado que los adultos puede permanecer en este estado durante periodos próximos al año, mientras que los recién nacidos no suelen superar los dos meses, y la resistencia del huevo a la sequía se puede considerar nula (Kendall, 1949b; Boray, 1963; Hope Cawdery y col., 1978).

La humedad será la responsable del número de generaciones que puede presentar L. truncatula (generalmente 3 en terrenos permanentemente húmedos y 1 ó 2 en los de humedad temporal). La capacidad de estivación durante periodos muy prolongados explicaría la aparente ausencia de limneas en áreas enzoóticas, donde pueden reaparecer repentinamente con el retorno de las condiciones favorables de humedad. El retorno de la humedad al hábitat del caracol, tras un prolongado

período de sequía, produce un marcado estímulo sobre la maduración del molusco, que se reproduce entonces con extremada rapidez. Este fenómeno, señalado por Kendall (1949b), es considerado por Ollerenshaw (1959) como el resultado de la expansión del área de colonización que, provocada por la coincidencia de humedad y temperatura favorables, reduce la presión por superpoblación y permite un rápido desarrollo de los ejemplares.

Sobre el efecto que la estivación del hospedador intermediario infestado tiene sobre el parásito, Kendall (1949b) afirma que no sólo retrasa el desarrollo de las cercarias sino que, en caso de estar ya formadas, morirán y serán reabsorbidas en gran número si la ausencia de humedad se prolonga. Durante la estivación de las limneas, el desarrollo del parásito se lentifica en dependencia de las reservas alimenticias disponibles. Por otra parte, con la reactivación del hospedador, el desarrollo larvario del parásito se produce con extremada rapidez.

El efecto que la falta de humedad tiene sobre el desarrollo larvario intramolusco puede ser considerado como el resultado de la lentificación a que se ve obligado el parásito para evitar el agotamiento de las reservas del hospedador y, en este sentido, la estivación del caracol tendría las mismas reparaciones sobre el parásito que las que tienen los estados de inanición del hospedador intermediario.

1.2.5.c.- NUTRICION.

Ya a comienzos de este siglo, se indicó que existía una importante relación entre el grado de parasitación de los moluscos y su estado nutricional. Posteriormente, en estudios de laboratorio, Kendall (1949a) comprobó que el grado de

nutrición del caracol influye directamente sobre la velocidad de desarrollo del parásito, de manera que la cantidad de alimento disponible para las redias supone un control para el número de cercarias que maduran en un momento dado, pero no sobre su grado de receptividad a la infestación (Kendall, 1965).

Parece, por otra parte, que la escasez de alimento sólo tiene repercusiones negativas sobre la velocidad de desarrollo del parásito, cuando el grado de infestación es elevado. A su vez, si se considera el tamaño de los moluscos un signo de su estado nutricional, se puede indicar que éste también influye sobre el potencial reproductor del parásito. Así lo demuestra la formación de una gran cantidad de redias en caracoles de gran tamaño (Kendall & Ollerenshaw, 1963; Rondelaud & Barthe, 1978b) o el hecho de que el número de metacercarias producidas por una población pequeña de limneas sea igual al que liberan grandes poblaciones cuando su estado nutricional, o el número de individuos adultos, es el mismo (Boray, 1963; Boray y col., 1969; Harris & Charleston, 1976; Owen, 1989).

Por último, quisieramos recordar que las posibilidades de alimentación del caracol dependen en gran medida de las condiciones climáticas, por la influencia que éstas tienen sobre el crecimiento de la flora de que éste se alimenta.

1.2.6.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMISION DE LAS CERCARIAS.

La cinética de emisión de cercarias no presenta un modelo regular, sino que, una vez formadas pueden acumularse en el molusco en gran número, abandonándolo en grupos, de forma continua o discontinua, durante periodos más o menos prolongados. Dicha variabilidad cinética ha sido observada en

L. truncatula y en L. glabra y es independiente de la intensidad de luz (Kendall & McCullough, 1951; Bouix-Busson y col., 1985).

Se ha considerado que la emisión es el resultado del paso de estado de reposo al de actividad del caracol, lo que genera movimientos convulsivos en las paredes del manto y provoca la expulsión, una a una y con gran fuerza, de las cercarias, que tienen un papel pasivo en este proceso. La estimulación de la actividad del hospedador intermediario responde a cambios repentinos en el hábitat, generalmente de origen físico. Aunque se ha indicado que los choques térmicos son en L. truncatula el principal factor desencadenante (Boray y col., 1969), determinadas investigaciones atribuyen a la temperatura un efecto estimulante nulo e, incluso, inhibitorio cuando actúa por debajo de 8-10°C (Kendall & McCullough, 1951; Al-Habbib & Grainger, 1983) e indican que es el agua, por renovación o adición al de los hábitats antiguos o secos, el principal estímulo en la liberación de las cercarias (Kendall & McCullough, 1951; Boray, 1969).

Este efecto activador de la renovación del medio puede responder a la acción inhibitoria que ejerce el acúmulo de sustancias de deshecho, como el CO₂, en los hábitats estancados. No ha podido atribuirse, sin embargo, este efecto inductor a la variación del pH que el cambio de agua conlleva (la emisión se produce a cualquier pH en el rango 5.5-8.5), ni al aumento de la concentración de O₂. Tampoco se observan diferencias significativas con el empleo de uno u otro tipo de agua (artesianas, destilada o de grifo).

Por todo lo expuesto, la lluvia, como afirma Kendall (1960), o la irrigación de los cultivos con la implantación de regadío, como señala Boray (1969), constituyen en el campo el estímulo principal para la emisión cercariana. Sin embargo,

una vez que las condiciones climáticas han favorecido el desarrollo larvario y la completa maduración de las cercarias, la falta temporal de lluvia es irrelevante en la epizootiología de la fasciolosis, pues en estas épocas los periodos de sequía no suelen prolongarse, y la alternancia sequía-humedad estimula la eliminación masiva de cercarias (Ollerenshaw, 1959; Boray, 1969).

1.2.7.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ENQUISTAMIENTO DE LAS CERCARIAS.

Una vez que abandona el hospedador, la cercaria nada a gran velocidad, propulsada por su cola, en el intento de alcanzar el lugar y objeto adecuados para su fijación y posterior enquistamiento. En estos desplazamientos, para los que, se considera, dispone de un máximo de una hora, la cercaria tiende a permanecer en la superficie del agua; geotropismo negativo que es interpretado como un mecanismo que el parásito adopta para facilitar el encuentro con el hospedador definitivo (Taylor, 1965; Pecheur, 1967).

El fototropismo negativo que presenta la cercaria impide el asentamiento en lugares muy expuestos a la luz solar, lo que protege a la metacercaria de la muerte rápida por desecación. Parece presentar una mayor afinidad por las superficies lisas y suaves: plantas tipo Juncus sp. y, en menor medida, Ranunculus repens y Glyceria fluitans (Pecheur, 1967), tipo de vegetación que es muy frecuente en los hábitats de L. truncatula (Simón Vicente, 1968; Moens, 1981; Wright & Swire, 1984). La cercaria puede, también, englobada en una burbuja de aire, enquistarse en la superficie del agua (Boray, 1969). Por otra parte, debe descartarse todo posible efecto de atracción atribuible al color de la superficie de asentamiento, así como cualquier poder de infestación antes de

su enquistamiento y subsiguiente maduración, que suele completarse en 1-3 días (Boray, 1963; Taylor, 1965; Pecheur, 1967).

1.2.8.- RESISTENCIA DE LAS METACERCARIAS A LOS FACTORES AMBIENTALES.

La supervivencia de las metacercarias en la hierba permitirá la transmisión de la fasciolosis en aquellas épocas no favorables para la emisión de cercarias. Los primeros estudios sobre la resistencia de las metacercaris en el medio ambiente se remontan a finales del siglo pasado, estableciéndose, ya entonces, que es necesario un cierto grado de humedad, por lo que, en el fango húmedo pueden mantenerse viables hasta dos semanas y mueren rápidamente en desecación (Leuckart, 1886 cit. por Olsen, 1947).

La escasa resistencia de las metacercarias a la exposición directa a las radiaciones solares o desecación, en contraposición con su capacidad de supervivencia en condiciones de alta humedad, ha sido, con posterioridad, demostrado por diversos autores, citados en muchas revisiones (Olsen, 1947; Boray, 1969; Gómez Bautista & Luzón Peña, 1989).

Puesto que la exposición al aire de las metacercarias, bajo la acción solar directa, las destruye en pocos días e incluso en horas, es improbable que puedan sobrevivir a la desecación que se origina durante el procesado de la hierba para su henificación. Sin embargo, si éste se realiza con hierba muy húmeda, pueden mantener su capacidad infestante hasta 8 meses (Marek, 1927 cit. por Olsen, 1947). El ensilado, por el contrario, pese a mantener un elevado grado de humedad, conlleva unas condiciones de anaerobiosis y altas temperaturas que originan una rápida destrucción de las metacercarias

(Kendall, 1965).

Sobre el grado de humedad requerido para que exista una supervivencia prolongada, se considera que un 70% sería suficiente. Pese a ello, bajo este grado de humedad, la resistencia de las metacercarias es mayor a bajas temperaturas que a las estivales. Sirvan, en este sentido, los datos de Boray & Enigk (1964) en los que con una humedad relativa del 90% la viabilidad no superó los 27 días a 20°C, mientras que con la misma humedad pero a 10°C se mantuvieron viables durante al menos 122 días.

La resistencia de las metacercarias a las bajas temperaturas es muy elevada. Así, en refrigeración e inmersas en agua pueden mantenerse viables hasta más de 11 meses (Over & Dijkstra, 1975). Cuando se produce la congelación del agua, su máxima resistencia es de 3 meses (a -2°C); temperaturas inferiores aceleran su muerte. Sin embargo, las metacercarias resisten mejor las temperaturas por debajo de cero que la desecación (Boray, 1969).

A elevadas temperaturas, el descenso de la viabilidad es progresivo y así a 10°C se mantiene el poder infestante hasta 130 días, a 25°C hasta 36 días y a 30°C solamente 14 días (Boray & Enigk, 1964, cit. por Boray, 1969).

Parece, pues, que gran parte de las metacercarias enquistadas en la hierba, a partir de comienzo del otoño, pueden resistir las condiciones ambientales hasta comienzos de la primavera siguiente, coincidiendo con la época de no emisión de cercarias por los caracoles. Sin embargo, las cercarias enquistadas durante mayo y junio alcanzan en sólo 4 semanas un 50% de mortalidad. La importancia epizootiológica de la resistencia de las metacercarias es, pues, grande si se considera que, en general, el invierno es una época poco

propicia para la emisión de cercarias. Durante el periodo estival, sin embargo, en las zonas donde existan hábitats permanentes para el caracol, la emisión estará garantizada durante todo el verano.

Es opinión generalizada que las metacercarias pueden sobrevivir a las temperaturas invernales que se presentan en Europa o los Estados Unidos de América donde, por el contrario, en primavera y verano, coincidiendo con las épocas de pastoreo, la infectividad se pierde en pocos meses (4-8 semanas) (Boray, 1969; Ollerenshaw, 1971b; Over & Dijkstra, 1975; Shaka & Nansen, 1979; Meek & Morris, 1979; Malone, 1986). Sin embargo, en un estudio de campo realizado en Holanda, Over & Dijkstra (1975) no lograron encontrar metacercarias en los pastos al finalizar el invierno; del mismo modo, Hope Cawdery (1975) en el oeste de Irlanda, apreció que tras inviernos muy crudos el campo puede estar libre de metacercarias en marzo.

A esta misma conclusión -menor importancia de las metacercarias hibernantes en la transmisión de la que cabría esperar por su elevada resistencia a las bajas temperaturas-, habían llegado ya Boray y col. (1969), en Australia, al observar que las metacercarias no sobreviven tanto tiempo en el campo y que las infestaciones en el hospedador definitivo suelen producirse por ingestión de cercarias recién eliminadas. Esta opinión también es suscrita por Pechaur (1979) en Bélgica, donde, según el autor, la dureza de los inviernos determinará que la única posibilidad de continuación del ciclo en esta época sea el "overwintering" del parásito en el caracol, y por Craig Hoover y col. (1984) en Idaho (USA), donde las temperaturas medias desde octubre hasta abril no suelen superar los 10°C, lo cual, consideran, produce el deterioro total de las metacercarias durante esa época.

Sobre el papel que pudieran tener las metacercarias que superan el invierno en la hierba, Ollerenshaw (1966, 1967, 1971b) opina que éste es despreciable considerando que gran parte de la hierba contaminada es consumida por los animales al comienzo del pastoreo (marzo). A partir de ese momento y puesto que los animales tienden a consumir solamente la hierba nueva, cuyo crecimiento diluirá la contaminación existente, la mayor o menor prolongación de la viabilidad de las metacercarias será irrelevante desde un punto de vista epizootiológico. Por otra parte, Over & Bijlstra (1973) y Shaka & Nansen (1979) demostraron que la viabilidad de las metacercarias que sobreviven al invierno decae de forma acusada a partir de marzo.

Otro factor a considerar es el desprendimiento progresivo de la hierba que sufren las metacercarias con el paso del tiempo que, si bien no influirá en su infectividad, actuará sobre las posibilidades de ser consumidas por el hospedador definitivo y, en consecuencia, sobre la contaminación cuantitativa de los pastos. Según los muestreos realizados por Ollerenshaw (1971b) en los pastos en Gran Bretaña, son los meses comprendidos entre finales de septiembre y de diciembre los que presentan una mayor densidad de metacercarias y, por tanto, serán los de mayor riesgo de infestación para el hospedador definitivo.

1.1.9.- DINAMICA DE LA TRANSMISION AL HOSPEDADOR DEFINITIVO.

Según los trabajos realizados sobre la biología de F. hepática en Gran Bretaña y gran parte de Europa, se puede observar emisión de cercarias por el hospedador intermediario entre mayo y septiembre-octubre. La interrupción en determinadas zonas secas durante el verano reduciría dicho periodo a mayo-junio (por eliminación de cercarias procedentes de la infestación hibernante en el caracol) y septiembre-

octubre (consecuencia de la infestación de verano del caracol y supervivencia a la estivación), existiendo una mayor capacidad contaminante en esta segunda emisión.

El periodo de riesgo para el hospedador definitivo, sin embargo, no se limita al de liberación de cercarias por el molusco pues, aunque en opinión de Boray (1969) son las metacercarias recién eliminadas las que provocan la infestación del hospedador definitivo, su capacidad de resistir las temperaturas del otoño e invierno ampliaría el periodo de riesgo hasta la primavera del año siguiente, enlazando con el comienzo de emisión de cercarias por los caracoles infestados en verano-otoño que hubieran sobrevivido a la hibernación. De este modo y en dependencia de las condiciones climáticas que se presenten en las diferentes áreas, la dinámica de la transmisión al hospedador definitivo muestra determinadas características.

Así, en el Reino Unido las pérdidas por fasciolosis aguda se producen de julio a octubre, como consecuencia de la infestación hibernante del caracol, y de octubre a junio por infestación de verano del caracol, siendo siempre de mayor intensidad y extensión esta última (Ollerenshaw, 1966).

En Francia, la infestación natural de los bóvidos se presenta en las zonas de alta montaña de la Cerdagne, entre finales de verano y principios del otoño (Mage, 1989a) y, principalmente, al final de la época de pastoreo (septiembre-octubre) en la región de Limousin (Mage, 1989b).

En España, en las altas montañas de la provincia de León la mayor incidencia se presenta en ganado vacuno a finales del verano y comienzos de otoño (González-Lanza y col., 1989); en las zonas de regadío de la provincia de Salamanca, Simón Vicenta & Ramajo Martín (1983) encuentran brotes de

fasciolosis aguda en ganado ovino y vacuno entre los meses de noviembre y enero (y algunas veces en septiembre), y fasciolosis subaguda, en ambas especies, en febrero, marzo, abril y noviembre. En otras zonas de España, existen datos sobre la prevalencia de la fasciolosis, en los que no se precisan las épocas de mayor incidencia; tal es el caso, en los últimos años, de los estudios realizados por Uriarte y col., 1985; García & Juste, 1987; Reina y col., 1987; Díez Baños y col., 1989; Gómez García y col., 1989 y Peinado Peláez y col., 1989.

En general, este modelo -baja transmisión en primavera y muy alta en otoño, presentándose la más alta incidencia y mayores pérdidas a finales de verano y comienzos del otoño (agosto-septiembre alargándose incluso hasta diciembre-febrero)- es el que se ha encontrado en la mayoría de los países europeos (Irlanda, Dinamarca, Holanda, Francia, Escocia), en algunas áreas de Australia (norte de Victoria) y U.S.A. (Idaho) (Ross, 1967 y 1977; Urquhart y col., 1970; Mansen & Shaka, 1975; Over & Dijkstra, 1975; Meek & Morris, 1979; Craig, 1984; Mage, 1989a y b). Este modelo de transmisión (durante la segunda mitad del año) se invierte en determinadas zonas, donde la primera parte del año se convierte en más peligrosa para el ganado; tal es el caso de Louisiana, área central de Florida y Costas del Golfo en Estados Unidos de América, o de Nueva Zelanda (Harris & Charleston, 1976; Craig & Bell, 1978; Malone y col., 1984/85; Boyce & Courtney, 1990).

2.- MATERIAL Y METODOS

2.-MATERIAL Y METODOS

2.1.- ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE LOS NUEVOS DE Fasciola hepatica.

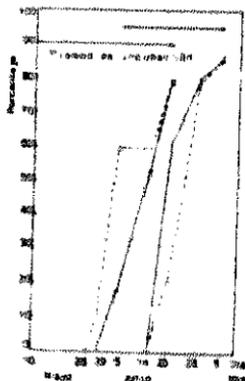
Para el estudio de las épocas del año en que existe desarrollo de los huevos de F.hepatica, la supervivencia de los mismos en el interior de la materia fecal, y la influencia del tiempo de permanencia en ésta sobre su desarrollo, se realizaron dos experiencias sucesivas de un año de duración cada una, cuyas condiciones de trabajo, comunes a ambas, se eligieron considerando previamente los factores siguientes:

-Influencia de la luz sobre el desarrollo de los huevos:

Puesto que la luz solar directa parece favorecer el crecimiento de algas en los cultivos de huevos en agua, que podría influir negativamente sobre su desarrollo, se optó por emplazar nuestras experiencias en una zona permanentemente umbría, y por utilizar para los cultivos, recipientes de polietileno (60 cc) con un grado de refracción parcial, permitiendo la incidencia de una intensidad media de luz, con la intención de que no influyera sustancialmente en la embrionación, pero favoreciese la eclosión.

-Grado de aireación: A pesar de que, como se indica en la revisión bibliográfica, la tensión de oxígeno no parece influir decisivamente sobre la supervivencia y el desarrollo de los huevos de F.hepatica, para descartar cualquier efecto atribuible al grado de aireación al que fueran sometidos nuestros cultivos, se realizó un estudio previo de corta duración, exponiendo cultivos duplicados de huevos a las temperaturas de los meses de mayo y junio, en recipientes tapados y destapados (de las características anteriormente indicadas), no observándose diferencias significativas en la supervivencia ni tiempos de desarrollo de los huevos

incubados en unas u otras condiciones, como se muestra en la Figura siguiente:



A la vista de tales resultados, y para prevenir las contaminaciones por insectos u otros agentes, y evitar la evaporación, los cultivos se realizaron en recipientes provistos de tapadera. No obstante, considerando el grado de protección térmica que estas condiciones podrían conferir a los huevos y sobre la base de los datos obtenidos durante el primer año de nuestro estudio, en el segundo año se incubaron las muestras por duplicado, en frascos tapados y destapados, durante los meses de posibles heladas (octubre-enero) o temperaturas extremadamente elevadas (julio-agosto).

- Influencia de la presencia del hospedador intermediario:
 Dado que tampoco existen datos que hagan referencia al efecto que pudiera ejercer la proximidad de las lixneas sobre la velocidad de desarrollo y eclosión de los huevos, se realizó una prueba previa, consistente en la exposición simultánea en el medio ambiente de 6 muestras (3 "testigo" y 3 "problema") con igual número de huevos (ca. 700 por muestra) extraídos de heces recién eliminadas e incubados en 50 ml de agua, en frascos de polietileno sencerrados (para permitir un cierto

grado de oxigenación a los moluscos). A cada una de las muestras "problema" se añadieron 7 ejemplares de *Lymnaea truncatula* (tamaños iniciales: tres de 0.3 cm; tres de 0.4 cm; y uno de 0.5 cm) el mismo día de su exposición al medio ambiente. La siguiente Tabla muestra el número de días transcurridos desde el inicio de la incubación hasta el comienzo y final de la embrionación y eclosión y los porcentajes alcanzados en uno y otro lote. El Lote A representa la media aritmética obtenida con los tres lotes testigo, y el Lote B equivale al valor medio alcanzado en los lotes problema.

	EMBRIONACION			ECLOSION		
	comienzo	final	(%)	comienzo	final	(%)
Lote A	24-26 d.	47-50 d.	87%	36 d.	97 d.	75%
Lote B	23-25 d.	45-47 d.	93%	34 d.	90 d.	84%

Las escasas diferencias encontradas en los porcentajes y tiempos de embrionación entre ambos grupos de muestras, nos indujeron a trabajar con cultivos de huevos en ausencia de limneas, lo que nos permitiría controlar mejor los momentos de infestación del hospedador intermediario, y por tanto, la duración del desarrollo larvario intramolusco, otro de los objetivos de nuestras experiencias.

2.1.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL.

2.1.1.a.- EXPERIENCIA I. (Octubre/1987 - Septiembre/1988).

Para el desarrollo de esta experiencia se configuró un "año estándar", por agrupación de los meses en periodos meteorológicos o "estacionales". Para ello, a partir de los

datos procedentes del Instituto Nacional de Meteorología, facilitados por el Observatorio Meteorológico de la Ciudad Universitaria de Madrid sobre las temperaturas medias mensuales, calculadas para el periodo [1976-1985] en 4 Estaciones Meteorológicas de Madrid (ver Figura adjunta), y sobre las Humedades Relativas medias mensuales registradas en dos de ellas durante el mismo periodo, se calculó una media térmica e higrométrica mensual como a esas cuatro Estaciones Meteorológicas, agrupándose en un mismo periodo estacional aquellos meses con medias térmicas próximas. El "año estándar" así diseñado quedó dividido en 6 "periodos estacionales", que denominamos "Otoño I", "Otoño II", "Invierno", "Primavera I", "Primavera II" y "Verano", con las características que se indican a continuación:

Mes	T _m (°C)	H.R.	Periodo Est.	T _m (°C)	H.R.
Oct.	14.7	65%	Otoño I	14.7	65%
Nov.	8.8	70%	Otoño II	8.8	70%
Dic.	5.4	77%	Invierno	5.6	74%
En.	5.2	75%			
Fer.	6.3	71%			
Mar.	9.5	61%	Primavera I	10.9	61%
Abr.	12.3	60%			
May.	16.2	56%	Primavera II	18.4	53%
Jun.	20.7	50%			
Jul.	24.7	41%	Verano	22.9	45%
Ag.	24.0	43%			
Sep.	20.2	52%			

Coincidiendo con el comienzo de cada periodo así delimitado, se recogieron heces procedentes de animales infestados experimentalmente: "donadores". Dichas heces,

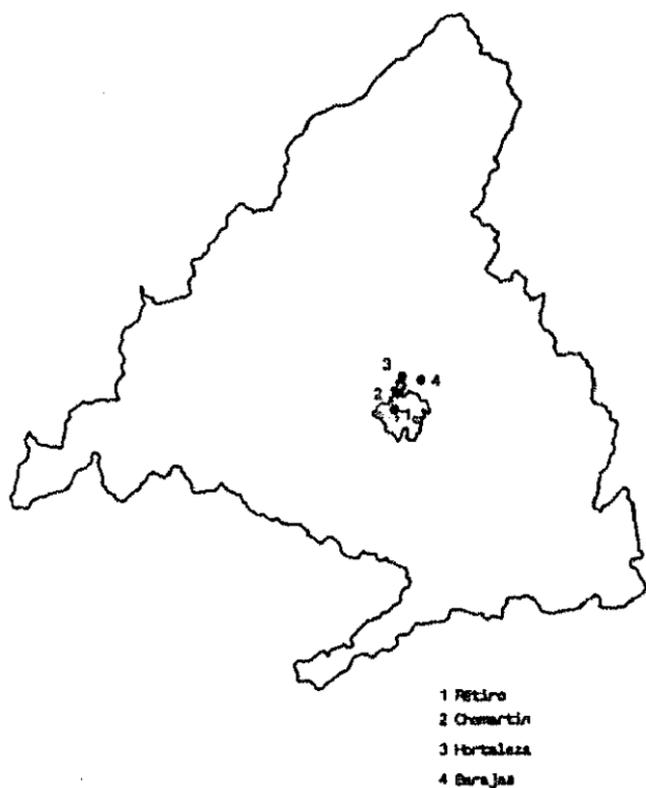
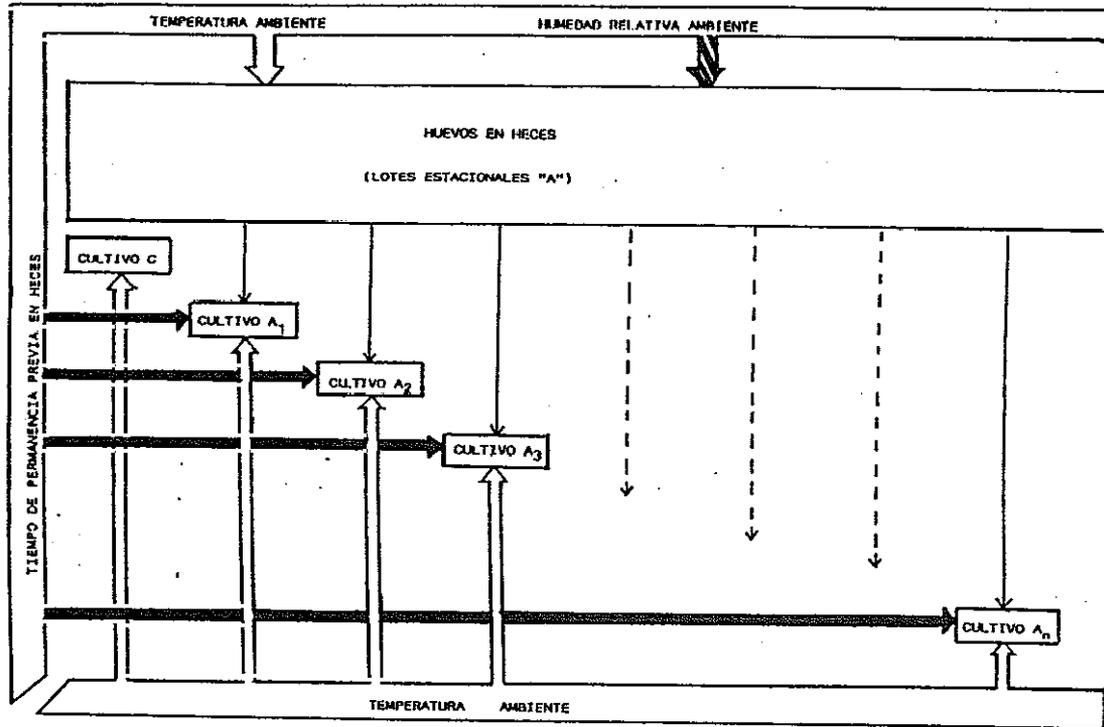


Figura I: Mapa de la Comunidad de Madrid con la localización de la zona de estudio y estaciones meteorológicas consideradas en el registro de las temperaturas y humedad relativa para la división de los periodos estacionales.

ESQUEMA I



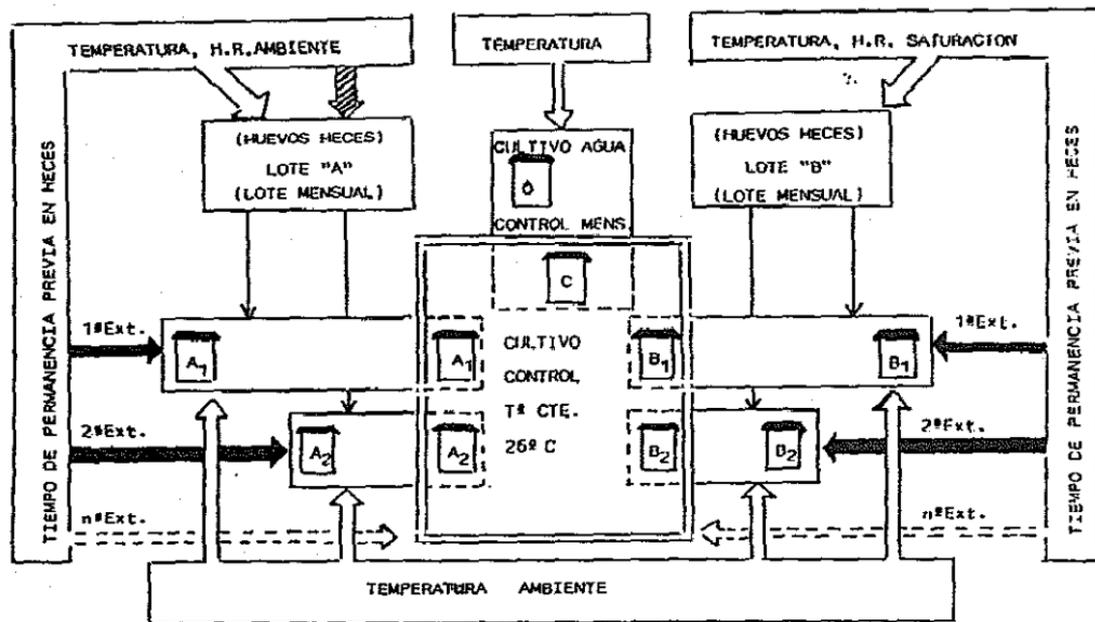
convenientemente disgregadas, fueron inmediatamente expuestas a la acción de las temperaturas y humedades relativas ambientales, constituyendo los llamados "lotes estacionales", cuya finalidad fue conocer la influencia de la T^a, H.R. ambiente y tiempo de permanencia en las heces sobre la supervivencia y posterior desarrollo de los huevos de F.hepatica.

Como se indica en el Esquema I, regularmente y con distinta periodicidad -mensual, quincenal o semanal-, según la época del año, se tomaron muestras de heces de cada "lote estacional", de las que se liberaron los huevos siguiendo la metodología que indicaremos mas adelante. Incluidos en agua, estos huevos se incubaron en el medio ambiente para formar los "cultivos" que nos permitieran conocer el efecto del tiempo de permanencia previa en heces sobre su supervivencia y posterior desarrollo. Paralelamente, al comienzo de cada mes, y coincidiendo en algunos casos con la formación de los "lotes estacionales", se recogieron heces del mismo animal donador, para la liberación inmediata de los huevos de la materia fecal, su inclusión en agua e incubación en el medio ambiente, constituyendo los denominados "cultivos mensuales". Estos cultivos nos permitirían analizar el efecto de la T^a ambiental sobre la supervivencia y desarrollo de los huevos de F.hepatica liberados de las heces inmediatamente después de ser éstas eliminadas por el hospedador definitivo.

2.1.1.b. EXPERIENCIA II. (Octubre/1968 -Septiembre/1969).

Con el propósito de conocer con mayor exactitud la influencia de los factores estudiados en la experiencia I y a la vista de los resultados obtenidos en ésta, durante el año siguiente se desarrolló una segunda experiencia, como réplica de la anterior y en la que se consideraron, además, otros factores. A tal fin se trabajó como indicaremos a

ESQUEMA II



continuación y según el modelo representado gráficamente en el Esquema II.

Se recogió al comienzo de cada mes y durante todo el año, un volumen de heces que, convenientemente homogeneizadas y disgregadas, fueron distribuidas en dos Lotes (A y B) para su exposición inmediata al medio ambiente, a partir de cuyo momento, considerado como "día 0 de exposición", comenzaría, al igual que en la experiencia I, nuestro estudio.

LOTE A: LOTE MENSUAL: Equivalente a los **LOTES ESTACIONALES** de la experiencia I, pero de exposición mensual, y en los que las heces, mantenidas a la intemperie, se someterían, no sólo a las T^a y H.R. ambientales, sino también a las precipitaciones correspondientes. Con ello se pretendió analizar las posibilidades de supervivencia y desarrollo de los huevos de *F.hepatica* en dependencia del tiempo de permanencia en heces depositadas en terrenos cuyas únicas fuentes de humedad fueran la H.R. ambiental y la pluviosidad.

LOTE B: LOTE MENSUAL: Equivalente al **LOTE A**, pero en medio permanentemente mantenido a saturación de agua: Heces disgregadas, protegidas de la lluvia y mantenidas a H.R. 100% durante toda la experiencia. De este modo se intentó estudiar la influencia que sobre la supervivencia y desarrollo de los huevos de *F.hepatica* tiene su permanencia en heces depositadas en terrenos permanentemente húmedos, con la suficiente capacidad de retención para mantenerlas constantemente con agua a saturación (charcos, abrevaderos, acequias, márgenes de caminos, etc.).

CULTIVO C: CULTIVO MENSUAL : Diseñado y procesado de igual modo que el descrito para los **CULTIVOS MENSUALES** de la experiencia I, y con los mismos objetivos: huevos liberados al agua en el momento de su deposición, e incubados a T^a ambiente, con el fin de analizar la influencia de ésta sobre

la supervivencia y desarrollo de los huevos que son liberados de las heces a las pocas horas de su excreción por tener lugar en un medio acuoso.

Con periodicidad mensual, quincenal o semanal, según la época del año, se extrajo de cada LOTE MENSUAL (A y B) una cantidad de huevos similar a la de su CULTIVO MENSUAL (C), para proceder de igual modo que el descrito para éste, y formar igualmente los denominados cultivos (A y B), de idénticas características a las de los cultivos C, pero en los que además se pudiera analizar, como en la experiencia I, la influencia del tiempo de permanencia previa en las heces sobre la posterior supervivencia y desarrollo de estos huevos en agua.

Paralelamente se evaluó la viabilidad de estos huevos recién extraídos, mediante el control de su capacidad de desarrollo en estufa a la temperatura constante de 26°C, para lo cual, en el momento de liberación de la masa fecal, se realizaron réplicas de cada cultivo (A, B, o C), denominadas "CONTROL", a Tª constante.

En ambas experiencias (I y II), la extracción y formación de cultivos en los diferentes lotes de heces se mantuvo hasta que los huevos alcanzaron una mortalidad cercana al 100%, lo cual se comprobó, bien por observación directa de los huevos en su momento de extracción (experiencias I y II), o bien indirectamente, mediante el control de su capacidad de desarrollo a Tª constante (experiencia II). Asimismo, el estudio de los diferentes cultivos se dio por finalizado cuando se observó el agotamiento de la capacidad de desarrollo de los huevos por mortalidad, eclosión o ambas causas.

2.1.2.- RECINTO EXPERIMENTAL.

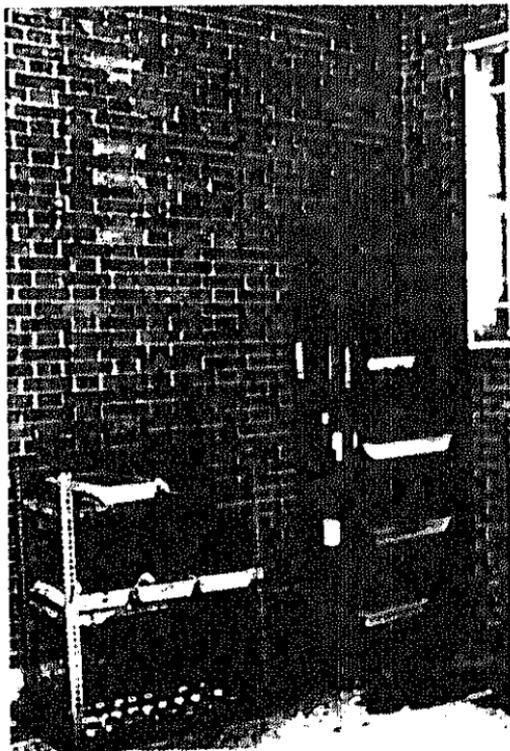


Foto 1: Recinto experimental.

Se utilizó como tal el patio exterior del Dpto. de Patología Animal I, eligiéndose una zona permanentemente umbría, de orientación noroeste, donde se colocó un armazón metálico formado por estantes dispuestos a distintas alturas del suelo, que se utilizó como soporte para los LOTES y CULTIVOS de las experiencias I y II, así como para los cultivos de líneas (ver Foto 1), cuyas características expondremos más adelante. Dicho armazón sirvió igualmente de estación meteorológica, donde se instalaron los aparatos de medición que se detallan en el siguiente apartado.

2.1.3.- REGISTRO DE LOS DATOS METEOROLOGICOS.

Las T^a máximas y mínimas y la H.R. ambiental diarias se registraron con un termómetro de máxima y mínima y un psicrómetro, respectivamente. Tales registros se efectuaron diariamente y siempre a la misma hora (12 a.m.), a la que también se registraron eventualmente las temperaturas del aire y del agua, esta última mediante un termómetro de contacto. Dichos termómetros y psicrómetro se instalaron en la sombra y a la altura de 1 m sobre el suelo, tal y como indican los manuales de medición de T^a y H.R. ambientales. Igualmente se anotaron los días en que hubo precipitaciones y heladas, registradas mediante la observación del interior de dos cubetas de plástico colocadas sobre el armazón a la intemperie.

2.1.4.- ORIGEN DE LAS HECEAS CONTAMINANTES DE HUEVOS DE *Fasciola hepatica.*

Con el fin de disponer en todo momento de heces con huevos de *F.hepatica*, se procedió a la infestación experimental sucesiva de tres animales de la especie ovina (dos hembras y

un macho), de raza manchega, a los que denominamos "donador I, II y III", según su orden de infestación, y cuya edad al comienzo de la misma se encontraba entre los 3 y los 14 meses.

Antes de cada infestación, los animales se desparasitaron con albendazol, comprobándose, mediante análisis coprológicos posteriores, la ausencia de formas parasitarias.

Las metacercarias empleadas para la infestación, tras haber sido separadas de su soporte con un pincel a las 24 h de su enquistamiento y sumergidas en agua destilada en el interior de placas de polietileno, fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su utilización. Su "edad" en el momento de ser administradas osciló entre 1-3 meses. Diariamente, en grupos de 10, fueron transferidas a la temperatura del laboratorio durante unos 15 minutos, al cabo de los cuales, mediante el uso de pipetas Pasteur y bajo la observación con estereomicroscopio, fueron incluídas con un mínimo volumen de agua en el interior de una doble cápsula de gelatina, que inmediatamente, de modo manual, se administró por vía oral al animal donador correspondiente. Cada animal recibió una dosis diaria de 10 metacercarias, durante 5 días semanales, a lo largo de un periodo de tres meses en el primer caso, y con las mismas pautas -pero durante periodos menos prolongados- los otros dos animales. La cantidad total de metacercarias suministrada a cada animal fue de 570 para el donador I, y 300 y 200 para los donadores II y III, respectivamente (dosis menores aplicadas, por producirse en el primer animal la muerte accidental y observarse en ésta una elevada carga parasitaria).

En todos los casos, tras la aparición de los primeros huevos en las heces -aproximadamente a los dos meses del comienzo de cada infestación-, hubo de transcurrir un mes más hasta la

estabilización de las eliminaciones, verificada por la observación de huevos morfológicamente viables y en un número que osciló entre 200 y 650 h.p.g., momento a partir del cual, comenzó la recogida de heces.

Para grandes cantidades (lotes estacionales de la experiencia I y lotes mensuales de la experiencia II), las heces se recogieron mediante bolsas recolectoras diseñadas al efecto, sujetas al animal con arneses, correspondiendo el número de gramos recogido cada vez a la cantidad total eliminada por un animal donador durante 12 h (ca. 450 g) o durante un día completo (ca. 900 g), para las experiencias I y II, respectivamente. Para cantidades pequeñas (a utilizar para la liberación inmediata de los huevos al agua "cultivos mensuales"), las heces se recogieron de forma manual, directamente de recto.

2.1.5.- FORMACION DE LOS LOTES DE HECES Y DE CULTIVOS EN AGUA.

Para la elaboración de los diferentes lotes de heces programados para cada experiencia, las heces recién eliminadas fueron homogeneizadas y disgregadas convenientemente con mortero y, en el interior de bandejas de polietileno de 6 litros de capacidad y 7cm de altura, ocupando las 3/4 partes de este volumen, se dispusieron en el recinto experimental de la forma en que se detalla más adelante. Para protegerlas de los insectos se recubrieron con una rejilla metálica.

La extracción de huevos de la materia fecal, requerida para la constitución de los cultivos, se efectuó mediante el macerado, con mortero, de la cantidad de heces oportuna (ca. 30 g) y suspensión en agua, filtrándose acto seguido a través de mallas de 300, 160 y 63 μm de diámetro de poro. El

material retenido en esta última se pasó a una copa de sedimentación de 500 cc donde, tras varios lavados por decantación, según los métodos tradicionales, se concentraron los huevos. En el sedimento así obtenido se efectuaron los recuentos convenientes para diluir una cantidad aproximada de 5000 huevos en 50 cc de agua de grifo en un recipiente de poliestileno de 60 cc de capacidad, provisto normalmente de tapadera, salvo en los casos indicados al principio de este capítulo. Periódicamente, se efectuaron mediciones del pH del agua del grifo y de los cultivos para analizar las posibles variaciones.

- DISPOSICION DE LOTES Y CULTIVOS EN EL RECINTO: Salvo los LOTES MENSUALES (A) de la experiencia II, colocados sobre el estante superior para su exposición a las precipitaciones, el resto de los lotes de heces y cultivos se distribuyeron en estantes inferiores, protegidos de la lluvia.

2.1.6.- ESTUDIO DEL RITMO DE LIBERACION ESPONTANEA DE LOS HUEVOS DE LA MATERIA FECAL AL AGUA. ("PRUEBA CONTROL").

Se recogieron las heces eliminadas por un animal donador a lo largo de 6 h y, tras efectuar el análisis cuantitativo de 10 g (por el método tradicional de sedimentación en copa), se mezclaron y distribuyeron, sin alterar su consistencia, en tres recipientes graduados de poliestileno de 1000 cc de capacidad. En cada uno se dispusieron 66 g de heces con 400 cc de agua.

Diariamente se efectuaron exámenes microscópicos del sedimento obtenido del volumen total de agua de cada recipiente. En cada muestra se realizaron tres recuentos, contabilizándose la media aritmética de los 9 recuentos realizados como el número de huevos liberados de las heces

cada 24 h. El ritmo de liberación/día se calculó como porcentaje respecto del total, para lo cual, tras el filtrado y recogida del agua de cada recipiente, las heces fueron redepositadas en el mismo, reconstituyéndose el volumen original de agua. Esta operación se realizó diariamente hasta que los nueva recuentos fueron negativos.

2.1.7.- ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LOS HUEVOS DE *F.hepatica*.

Para la observación del estado de desarrollo de los huevos, de cada cultivo, previa homogeneización, se analizó un volumen de 2 cc, que se distribuyó en dos cámaras de McMaster completas, efectuándose los llenados y las observaciones de forma independiente. Una vez cargadas, las cámaras fueron expuestas a la luz durante 5 minutos antes de la observación microscópica del sedimento (X100).

Los huevos de cada cultivo se examinaron microscópicamente en el momento de su extracción. Las observaciones posteriores se realizaron en los diferentes cultivos cada 15-30 días durante las épocas con temperaturas inhibitorias para el desarrollo y cada 7-3 días, dependiendo del ritmo de evolución, en las épocas favorables. En los cultivos control a temperatura constante de 26°, los análisis se realizaron cada 3-4 días.

2.1.7.a.- CRITERIO CUALITATIVO DE VALORACION:

Siguiendo los criterios utilizados por Vázquez Gómez y col. (1985), se consideraron 5 estadios de desarrollo en el huevo de *F.hepatica*:

1º.- Huevo en fase de mórula (Foto 2a).

2º.- Huevo alterado en fase de mórula (Foto 2b).

3º.- Huevo embrionado (con miracidio móvil en su interior) (Foto 2c).

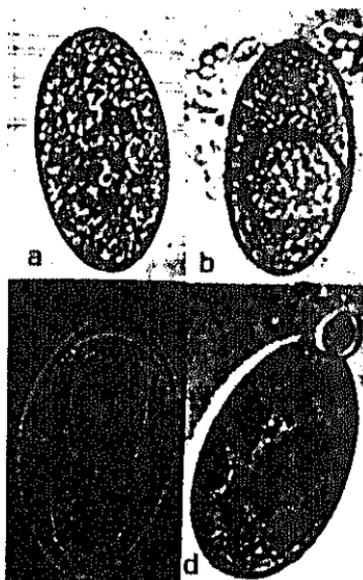


Foto 2. a: Huevo en fase de mórula.
b: Huevo alterado en fase de mórula.
c: Huevo embrionado.
d: Huevo eclosionado.

48.- Huevo alterado en fase de miracidio (deterioro morfológico y total inmovilidad).

51.- Huevo eclosionado (cáscara vacía, con opérculo levantado) (foto 2d).

2.1.7.b.- CRITERIO CUANTITATIVO DE VALORACION:

Los resultados del análisis cualitativo se expresaron en datos porcentuales respecto al total de huevos observados en cada cámara, procurando que la suma de todos los contados no fuese inferior a 100. El resultado final se obtuvo de la media aritmética de los obtenidos en las dos cámaras analizadas para cada cultivo.

2.1.- ESTUDIO DE LA RELACION F. hepatica / hospedador intermediaria.

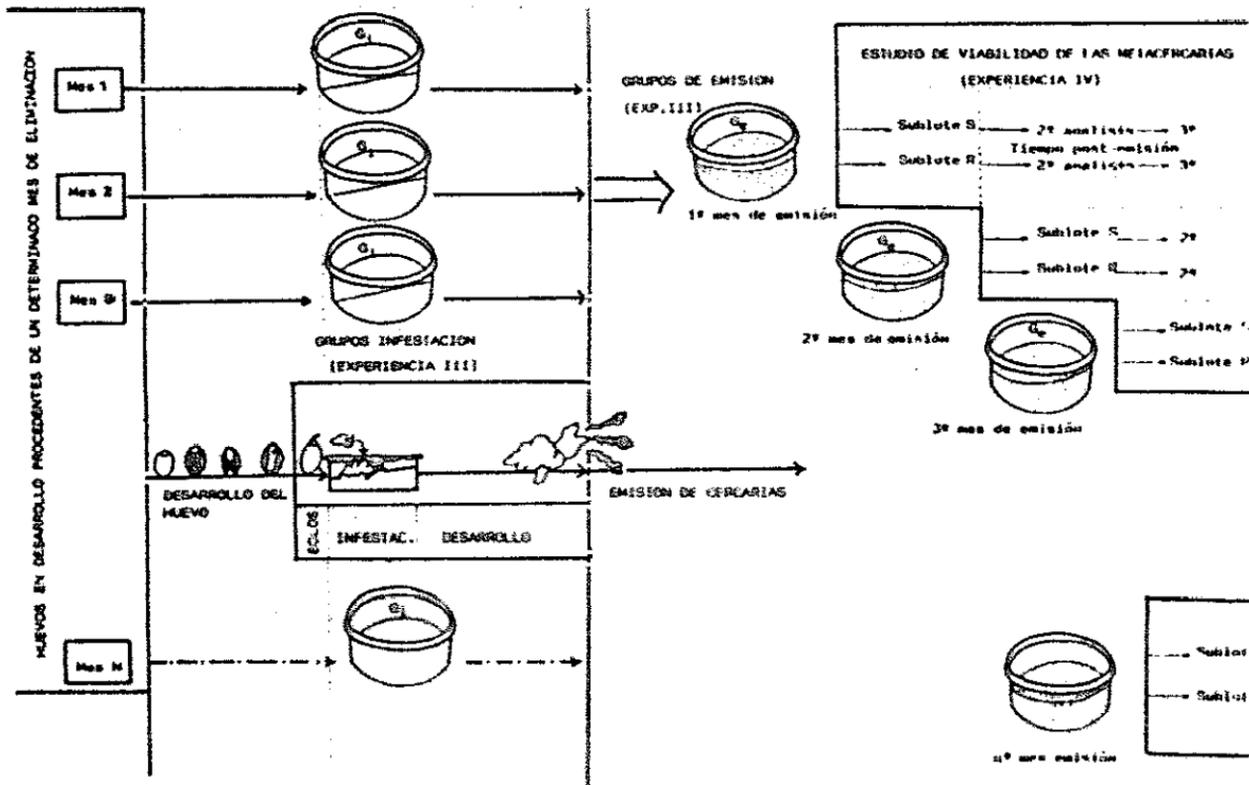
Para conocer la capacidad infestante de los miracidios, la viabilidad de tales infestaciones y la duración del desarrollo larvario intramolusco y del periodo de emisión de cercarias en relación con la T° ambiental, se diseñaron dos nuevas experiencias (III y IV), paralela y sucesivamente desarrolladas a las experiencias I y II:

2.1.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

2.1.1.a.- DESARROLLO LARVARIO INTRAMOLUSCO (Experiencia III).

Al observarse las primeras eclosiones en los cultivos mensuales de huevos en agua, se procedió a la contaminación del hábitat de los diferentes grupos o subpoblaciones de límnex que constituirían los GRUPOS DE INFESTACION (Gi). Según se expresa en el Esquema III, cada grupo, constituido por 5-10 límnex, se puso en contacto con los huevos de F.

ESQUEMA III



hepática procedentes de cada cultivo mensual de la Experiencia I (primer año), o con una mezcla a partes iguales del cultivo mensual y de todos los cultivos extraídos de su correspondiente lote de heces, con independencia del ritmo de desarrollo que éstos presentaran, y según la Experiencia II (segundo año). El número de "grupos de infestación" fue determinado pues, por los meses de procedencia de los huevos que llegaran a completar el desarrollo, y no por los periodos de eclosión. Las contaminaciones fueron realizadas con una suspensión de 100 huevos/lienea, que se añadió al agua ya existente en el hábitat de cada grupo (G1). En ningún momento a partir de entonces se renovó el medio líquido de los grupos (G1) así formados, manteniéndose el nivel mediante la adición periódica de agua.

Por cada GRUPO DE INFESTACION se mantuvo un GRUPO TESTIGO, compuesto por el mismo número de lineas, donde, paralelamente a los infestados (G1), se observaron las bajas producidas por muerte o por letargo y la emisión semanal de puestas.

Con la aparición de las primeras cercarias enquistadas en las paredes de los cristalizadores utilizados como hábitat para cada grupo (G1) -evidencia de que el desarrollo intramelusco se había completado- se procedió a individualizar los caracoles para comprobar su emisión y conocer el tiempo de desarrollo larvario intramelusco.

La experiencia se consideró concluida para cada grupo (G1) cuando comenzó la emisión de cercarias o, caso de no llegar a producirse, cuando tuvo lugar la muerte de las lineas.

1.2.1.b.-PERIODO DE EMISION DE CERCARIAS (Experiencia IV).

Todas las lineas que comenzaron a emitir cercarias en un determinado periodo se juntaron, independientemente de su

origen, en un nuevo hábitat común, para constituir los GRUPOS DE EMISION (Ge) correspondientes. Dicha experiencia se dio por concluida para cada grupo (Ge) con el cese total de la emisión de cercarias por muerte de las limneas (ver Esquema III).

2.2.2.- HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.

2.2.2.a.- ESPECIE: Se utilizó como hospedador intermediario una "cepa" de la especie *Lymnaea truncatula*, originaria de la provincia de Salamanca, cedida en el año 1984 por el Dpto. de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Salamanca y mantenida desde entonces en nuestro Departamento en condiciones óptimas de laboratorio. El número de limneas componentes de los grupos de infestación y testigos fue, como hemos indicado, de 5-20. El tamaño inicial elegido para éstas estaba comprendido entre 0.3 y 0.5 cm, tomados desde el ápice de la concha hasta su apertura, por ser el más adecuado para la infestación, según Over (1971).

2.2.2.b.- HABITATS Y ALIMENTACION: Para la constitución de un hábitat adecuado se utilizó tierra procedente del estrato superficial del suelo de un estanque situado a unos 200 m de las dependencias de nuestro Departamento, convenientemente tamizada y esterilizada en autoclave (20 min., 1 atm.Ng). La tierra se extendió, con una ligera pendiente (30°) y un máximo grosor de 2.5 cm, sobre el fondo de un cristallizador de vidrio (13 cm diám. int., 6 cm alt.) y se mantuvo total o parcialmente cubierta con agua (ver Esquema III).

Como alimento de las limneas se utilizó una mezcla de hojas de lechuga desecada y pulverizada, polvo de tiza y germen de trigo, en la proporción 3/5:1/5:1/5, respectivamente, que se espolvoreó sobre el agua de los hábitats en pequeñas dosis semanales.

2.1.3.- EVALUACION DEL DESARROLLO LARVARIO Y DE LOS PERIODOS DE EMISION.

La duración del desarrollo larvario intramolusco se determinó mediante el tiempo transcurrido desde el "día de infestación" (considerado como el día de contaminación del hábitat de limneas con los huevos) hasta la primera emisión de cercarias por cada molusco que llegara a eliminar dentro de cada grupo (G1).

El periodo de emisión se estableció como el tiempo transcurrido desde el comienzo de emisión de cercarias por los caracoles de cada "grupo de emisión" (G_e) hasta su cese total.

El número de limneas infestadas por "grupo de infestación" (G_i) se evaluó mediante la observación individualizada de la emisión de cercarias, y por la disección y observación con estereoscópio de las limneas que murieron sin haberse producido ésta. A partir de estos datos se calculó la tasa de infestación y el éxito de la misma, de la siguiente manera:

Tasa de infestación (%): $[\text{n}^\circ \text{ de limneas infestadas} / \text{n}^\circ \text{ de limneas (G}_i\text{)}] \times 100$ (para medir la capacidad de infestación relativa de los miracidios eclosionados en cada época).

Éxito de infestación (%): $[\text{n}^\circ \text{ de limneas que llegan a emitir cercarias} / \text{n}^\circ \text{ de limneas infestadas}] \times 100$ (como medida de la capacidad de las infestaciones para provocar contaminación por metacercarias).

2.1.- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS METACERCARIAS.

Delimitados los periodos de emisión de cercarias, nuestro siguiente objetivo fue determinar la resistencia de las

metacercarias a las condiciones ambientales a lo largo del año, para poder evaluar con mayor exactitud las épocas de riesgo de infestación para los hospedadores definitivos.

3.3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Constituidos los "grupos de emisión" (Ge) del modo descrito en la experiencia IV, se procedió -con objeto de separar las metacercarias por periodos de enquistamiento- al traslado mensual de las líneas emisoras de cada grupo (Ge) a un nuevo hábitat, donde se mantuvieron hasta el mes siguiente, y así sucesivamente, hasta que cesaron las emisiones, como se indica en el Esquema III. A cada nuevo cristallizador utilizado como soporte para las metacercarias se le asignó el nombre del mes de emisión correspondiente. En cada caso, se efectuaron los oportunos análisis de viabilidad, con periodicidad mensual o quincenal, según la época. Para ello, por cada LOTE DE METACERCARIAS (Lm) mensual, se consideraron, dentro del mismo cristallizador, dos grupos o SUBLOTES ("r" y "s"), que se examinaron por separado:

- SUBLOTE "r": Metacercarias mantenidas al 100% de H.R. desde su enquistamiento (permanentemente cubiertas con agua), para estudiar el efecto de la T° sobre ellas.
- SUBLOTE "s": Metacercarias sometidas a su desecación gradual, para conocer el efecto de las T° y H.R. ambientales.

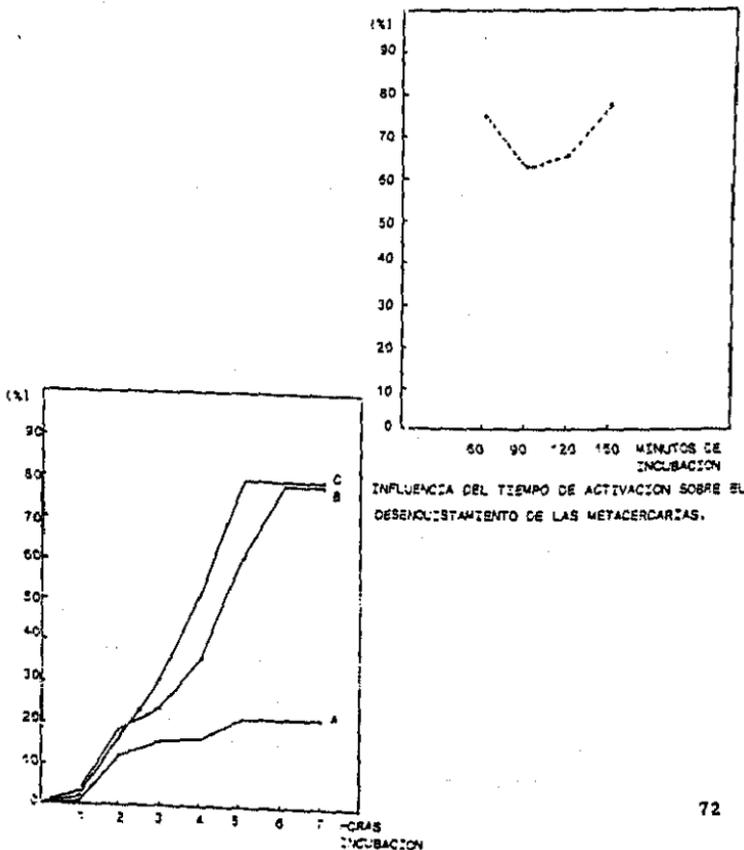
3.3.2.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Inmediatamente antes de cada examen, las metacercarias se desprendieron de su soporte de adhesión (pared del cristallizador) con la ayuda de un pincel humedecido. Una vez recogidas en un pequeño volumen de agua, se separaron a continuación en dos muestras independientes de 10-50 metacercarias cada una, con el fin de efectuar los análisis por duplicado para cada grupo "r" o "s".



3.3.3.- DESENUSTAMIENTO "IN VITRO".

La técnica de desenustamiento "in vitro", descrita por Tielens y col. (1981), fue ensayada previamente por nosotros con distintos tiempos de activación y desenustamiento para su estandarización, tal como se muestra en las Figuras siguientes, a partir de cuyos resultados se aplicó con tiempos de activación y desenustamiento de 1 y 6 h., respectivamente.



INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACTIVACION SOBRE EL DESENUSTAMIENTO DE LAS METACERCARIAS.

EFECTIVIDAD DEL DESENUSTAMIENTO DE LAS METACERCARIAS DE JERAMO A, Y DE COTOÑO B y C.

La validez de esta técnica como método de evaluación de la viabilidad de las metacercarias se comprobó comparando los porcentajes de desenquistamiento con la capacidad infestante en ratones (10 metacercarias/ ratón); con los resultados que se expresan en la siguiente Tabla:

DESENQUISTAMIENTO (%)	INFESTACION (%)
63.0	45.0
44.3	15.0
19.2	5.0
16.7	0.0
12.2	0.0
0.0	0.0

A partir de estos resultados se estableció como método de estudio de la resistencia de las metacercarias a las condiciones ambientales, su capacidad de desenquistamiento "in vitro".

2.3.4.- ANALISIS DE RESULTADOS.

2.3.4.a.- VALORACION CUALITATIVA:

Una vez desenquistadas las metacercarias, se examinaron bajo estereomicroscopio y se agruparon en tres categorías:

- Metacercarias "enteras" (sin desenquistar).
- Paredes "vacías" (cubierta quística abierta y vacía).
- Adolescarias (formas juveniles fuera del quiste y móviles).

2.3.4.b.- VALORACION CUANTITATIVA:

$$\text{Desenquistamiento (\%)} = \left(\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de adolescarias libres}}{\text{n}^{\circ}} \right) \times 100$$

de metacercarias iniciales) x 100.

El resultado porcentual se calculó por la media aritmética de las dos muestras analizadas en cada grupo "r" y "s" (H.R. 100% y H.R. ambiental).

2.4.- MATERIAL.

REGISTROS METEOROLOGICOS:

- Termómetro de Máxima y Mínima (Fortuna SHOTT)
- Termómetro de contacto (Fortuna SHOTT)
- Psicrómetro (COLUMBUS)
- Cubetas de plástico (500 cc)

INFESTACION DE DONADORES:

- Placas de polietileno (1 cm ϕ x 1.5 cm altura)
- Pinceles
- Punzones
- Pipetas Pasteur
- Cápsulas de gelatina
- Equipo Desmineralizador (R.100 MOD. PAT. Seta)
- Estereomicroscopio (NIKON)
- Transiluminador (INTRALUX 4000)
- Cámara de refrigeración

RECOGIDA DE HECES, FORMACION DE LOTES Y SUBLOTES.

- Bolsas recolectoras de cuero
- Arnéses de cuero o arpillera
- Guantes de plástico desechables
- Rejilla metálica
- Bandejas de polietileno (40 x 25 cm de base superior; 37 x

- 22 cm de base inferior; 7 cm de altura) (6 litros volumen)
- Cubetas de plástico (1000 cc)
 - Morteros de porcelana
 - Mallas metálicas de 300, 160 y 63 μm de ϕ de poro
 - Copas de sedimentación de plástico (500 cc)
 - Duquesas de polietileno transparentes (60 cc)
 - Agua de grifo
 - Papel Indicador Universal de pH (Neutralit MERCK)
 - Estufa (HERAEUS -electronic- BK 5060 E)

EXAMENES MICROSCOPICOS.

- Pipetas Pasteur
- Cámaras McMaster
- Microscopio óptico (LEITZ WETZLAR)
- Contadores celulares tipo monocanal

HABITATS Y ALIMENTACION DE LIMNEAS.

- Cristalizadores de vidrio (13 cm de ϕ interior x 6 cm de altura)
- Malla metálica poro grueso
- Frascos lavadores
- Autoclave (Autoester. MOD. 437 SELECTA)

CONTAMINACION DE LIMNEAS.

- Vasos de precipitado (50 cc)
- Pipetas graduadas (1 y 10 cc)
- Pipetas Pasteur

DISECCION DE LIMNEAS.

- Lancetas y punzones

- Pinzas de disección
- Alfileres entomológicos
- Pinceles
- Placas de Petri

DESEQUISTAMIENTOS.

- Equipo desmineralizador (R.100 MOD. PAT. Seta)
- Bombona (CO_2/N_2 60/40) 2,5 cc 50 bar (ALPHAGAZ)
- Cajas herméticas de polietileno
- Tubos de goma
- Baño agitador (UNITRONIC 320 OR SELECTA)
- Agitador (Agimatic SELECTA)
- Balanza monoplato (METTLER PE 2000)
- Balanza de precisión (METTLER H 43)
- pHmetro (micropH 2000 CRISON)
- Matraces aforados (1000 cc)
- Vasos de precipitado (100 y 50 cc)
- Tubos de ensayo (10 y 5 cc)
- Gradillas metálicas
- NaHCO_3 (PROBUS)
- NaCl (PANREAC)
- KCl (PANREAC)
- NaH_2PO_4 (MERCK)
- MgSO_4 (MERCK)
- CaCl_2 (MERK)
- Glucosa (PANREAC)
- Taurocolato sódico (SIGMA)

3.- RESULTADOS

3.-RESULTADOS

3.1.- ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LOS HUEVOS DE F.hepatica EN LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE MADRID.

3.1.a.- Periodo de temperaturas medias mensuales inferiores a 10°C. (octubre a febrero)

Las posibilidades de supervivencia de los huevos de F.hepatica excretados por el hospedador definitivo durante el periodo comprendido entre octubre y febrero, durante la mayor parte del cual en nuestro estudio (a partir de noviembre en ambos años, 1987 y 1988) las medias térmicas mensuales entre máximas y mínimas no superaron los 10°C (Gráfico I), resultarían dependientes de su rápida liberación de las heces al agua o, de no ser así, de la presencia constante en las heces de un 100% de humedad relativa.

Así ocurrió con los huevos excretados en octubre que permanecieron en heces expuestas a las condiciones ambientales de Tª y H.R., donde toda liberación de los huevos al agua posterior al día de excreción excluyó cualquier posibilidad de desarrollo a Tª ambiente, observándose en los incluidos en agua un ritmo de destrucción, en general, menor al presentado por los mantenidos en el interior de las heces aunque con tendencia a igualarse en las extracciones más tardías (A12, A13 y A14 en Exp.I y A4 en Exp.II, Gráf.Ia).

La mortalidad en el interior de estas heces, considerada bajo un punto de vista morfológico, no se apreció de modo significativo en el segundo año hasta finales de noviembre, a los dos meses de su excreción, momento a partir del cual, casi la totalidad de los huevos se destruyeron aproximadamente en cuatro semanas durante diciembre (A en Gráf.Oc.Ia, Exp.II). Dicha destrucción, sin embargo, se había retrasado en la Exp.I hasta

finales de abril (aproximadamente cinco meses después que en el 2º año), completándose también en unas cuatro semanas a lo largo de mayo (Gráf.Oc.Ia, Exp.I).

El escaso deterioro morfológico presentado durante el segundo año por los huevos mantenidos en heces a H.R. ambiente hasta comienzos de diciembre no mostró relación directa con sus posibilidades potenciales de desarrollo puesto que, con una aparente alteración de un 20% en las extracciones realizadas hasta finales de noviembre (A1, A2 y A3), su incubación en estufa a Tª cte. de 26°C sólo indujo a la eclosión en un 27-37%, siendo nulo el desarrollo bajo esta temperatura en los liberados de la materia fecal a comienzos de diciembre (A4) cuando su mortalidad aparente era del 30% (Tabla Oc.1). Es posible que esta pérdida de viabilidad funcional observada a primeros de diciembre también se presentara en el primer año, aunque al no disponer de controles a Tª cte. desconocemos este aspecto.

Como se muestra en el Gráfico Oc.Ib (Trayectoria B), cuando la H.R. en las heces fue del 100% y al igual que ocurriera en ese mismo año en heces bajo condiciones ambientales de H.R., el deterioro de los huevos se produjo durante la época fría (diciembre-enero) aunque a un ritmo más lento (compárense Trayectorias A y B en Gráf.Oc.II), por lo que al comienzo del periodo no inhibitorio para el desarrollo, en marzo en el 2º año (Tª media de 11.6°C, Gráf.I), aunque no se había alcanzado aún el 100% de mortalidad, la supervivencia era ya escasa (20%).

Cuando la liberación de estos huevos al agua se realizó con posterioridad al momento de excreción, sucesivamente hasta finales de marzo a partir de heces permanentemente a saturación de agua (B1,...,B8 en Gráf. Oc.Ib), la mortalidad producida en el agua durante el periodo desfavorable para el desarrollo fue semejante o algo superior a la existente en el interior de las heces. Sin embargo, con el cese de las temperaturas inhibitorias

para el desarrollo (a partir de marzo, Gráf.I), los huevos liberados al agua hasta entonces que aún permanecían morfológicamente íntegros se destruyeron sin que en ellos llegara a producirse desarrollo (B2, B3, B4 y B8 en Gráf.Oc.Ib). Este sólo tuvo lugar en los extraídos en abril y mayo, cuando el deterioro ya alcanzaba a la práctica totalidad de los huevos en el interior de las heces, causa pues del escaso porcentaje de eclosión en ellos observado (10% en B9 y 5% en B10, Tabla Oc.2).

Como mostraron las sucesivas incubaciones a T° cta. en el momento de liberación de los huevos al agua, la capacidad potencial de desarrollo de estos huevos mantenidos en el interior de heces al 100% de H.R. se conservó hasta las últimas extracciones, aunque el desarrollo se completaría en menor proporción que la que cabría esperar (en ningún caso la eclosión superó el 30%) dada la alteración existente en el momento de extracción (Tabla Oc.1).

En los huevos excretados por el hospedador definitivo en octubre y rápidamente liberados al agua -antes de las primeras 24 horas- (cultivo C), la mortalidad durante el periodo frío (hasta comienzos de febrero) mostró un patrón semejante al de los mantenidos en heces a saturación de agua (C y B en Gráf.Oc.Ib). Sus posibilidades de desarrollo fueron, sin embargo, superiores, al producirse a partir de febrero mayor mortalidad en el interior de las heces que en el agua, por lo que el porcentaje de huevos sin alterar en el agua al acabar el periodo inhibitorio para el desarrollo (marzo) fue mayor que en heces. Dicho porcentaje de supervivencia tras el invierno en los huevos inmediatamente liberados tras su excreción (90% en el primer año y 37% en el segundo), apenas excedió al de los que completaron su desarrollo con éxito en ambos casos (80% y 29% respectivamente), como se muestra en el Gráf.Oc.II.

Los primeros miracidios en el interior del huevo se

observaron a mediados de marzo, extendiéndose la embrionación hasta la mitad de abril, aproximadamente (Gráf. Oc.II). Las primeras eclosiones se produjeron ya a finales de marzo, pero el periodo de mayor liberación de miracidios tuvo lugar entre mediados de abril y primera semana de mayo, en el primer año, o durante la primera de mayo en el segundo.

El periodo de embrionación y eclosión de los huevos excretados en octubre podría quedar ampliado hasta mediados de junio (Gráf. IIA y IIB), si los huevos, que no fueran liberados al agua a las pocas horas de su excreción, permanecieran incluidos en heces a saturación de agua hasta el periodo en que las temperaturas mínimas superasen los 10°C (abril, ver Gráf. I).

El modelo de supervivencia de los huevos excretados con las heces durante el mes de noviembre fue parecido al de los excretados un mes antes. En el interior de heces a humedad relativa ambiente el deterioro fisiológico total se produjo al mes de su excreción, como mostraron en la Exp. II los controles a T¹ etc (Tabla Nv.1), coincidiendo con la fecha límite -5 día.- encontrada para la permanencia en las heces excretadas un mes antes y mantenidas en condiciones similares. Esta pérdida de viabilidad fue independiente del deterioro morfológico existente, que en los huevos excretados en noviembre no alcanzó el 100% hasta febrero-marzo (A en Gráf. Nv. Ia). A su vez, las posibilidades de superar con vida el periodo térmico desfavorable para el desarrollo (hasta marzo) resultaron depender de su rápida liberación al agua o de su permanencia durante el periodo frío (hasta febrero) en heces a saturación de agua (C, B5, B6, B7 y B8 en Gráf. Nv. Ib), siendo la mortalidad de los huevos en estas heces similar a la observada en los excretados en octubre (B en Gráf. Nv. Ib).

Fueron los huevos liberados en el momento de su excreción los que mostraron mayores posibilidades de desarrollo: 65% en el

primer año y 40% en el segundo (Gráf.Nv.II, Exp.I y II) frente al 15% presentado en todos los liberados de las heces a saturación de agua a partir de febrero (Tabla Nv.2). La liberación más importante de miracidios tuvo lugar en mayo, prolongándose la eclosión hasta finales de junio a consecuencia del desarrollo de los huevos liberados de las heces a saturación de agua a partir de febrero (Gráf.IIa y IIb).

Como sucedió con los huevos excretados durante estos dos meses de otoño, en los procedentes del mes de diciembre fueron los liberados rápidamente al agua tras la excreción los únicos con posibilidades de desarrollo en porcentajes importantes durante la primavera (a lo largo de abril y mayo, Gráf.Dc.II). Desarrollo que ni siquiera en estos huevos llegó a producirse en el medio ambiente, durante el segundo año de nuestro estudio, puesto que, siendo los únicos con capacidad potencial de desarrollo en el momento de la liberación de las heces (ver Tabla Dc.1), su viabilidad hacia mediados de marzo era ya nula, como demostró su incubación para esa fecha (16 marzo) en estufa a T^o cte. 26°C, a pesar de una aparente supervivencia del 36% en el agua a T^o ambiente para entonces (Gráf.Dc.I).

De modo similar a lo ocurrido con las excreciones procedentes del otoño, cuando los huevos se eliminaron en enero, su permanencia en heces mantenidas en condiciones ambientales de humedad y temperatura, excluyó cualquier posibilidad de desarrollo durante la época favorable.

Durante la primera quincena de este mes, dada la total pérdida de viabilidad observada en los huevos excretados en meses anteriores tras haber permanecido 15 días en heces a H.R. ambiental, se realizaron liberaciones sucesivas cada 2-3 días, apreciándose que no era posible el desarrollo a medio ambiente cuando habían estado incluidos en la masa fecal por un periodo superior a 4 días. Nótese en la siguiente Tabla el escaso

desarrollo de los huevos que permanecieron 4 días en estas heces.

TIEMPO TRANSCURRIDO EN HECEs (días)	MORTALIDAD (%) *	EMBRIONACION (%) *
0 días	71%	29%
4 días	92%	8%
7 días	100%	0%

* valores obtenidos durante la tercera semana de mayo.

Como se muestra en la Tabla En.1, a los 7 días de permanencia en heces a H.R. ambiente su capacidad de desarrollo a Ta cta. de 26°C sólo fue del 10%, presentando a los 9 días un absoluto deterioro funcional, aunque la integridad morfológica se prolongara hasta mediados de mayo, tanto en el interior de las heces como en los huevos liberados al agua hasta entonces (Trayectorias A, A2, A3, A4 y A5 en Gráf.En.Ia).

Garantizada la humedad relativa óptima (100%), la máxima longevidad de los huevos en el interior de las heces fue de unos 9 meses, hasta finales de septiembre aproximadamente (B en Gráf.En.Ib). Su viabilidad fue confirmada por la capacidad potencial de desarrollo en el momento de su liberación de las heces (Tabla En.1), y, en el medio ambiente, por el desarrollo hasta la eclosión durante el periodo favorable para el mismo (Tabla En.2).

Como se muestra en el Gráf.En.Ib, la permanencia en el interior de las heces a saturación de agua durante el invierno y comienzos de la primavera (hasta la segunda semana de abril aproximadamente, en nuestros resultados), proporcionó a los huevos una mayor supervivencia, y mayor oportunidad de desarrollo, por tanto, que cuando su liberación al agua se

produjo en cualquier momento durante ese periodo (compárense trayectorias C, B1, ..., B3 con B en el mismo Gráfico).

En estas condiciones de H.R. a saturación, por tanto, aunque todas las épocas de liberación de los huevos contribuyeron con miracidios al medio, existió más embrionación en las realizadas después de marzo-abril (cuando las temperaturas medias superaban los 10°C) y así, como se muestra en la Tabla En.2, las eclosiones procedentes de las extracciones realizadas durante el periodo enero-abril (C, B1, ..., B4), oscilaron entre un 11% y un 35%, sin existir relación alguna entre el porcentaje y el tiempo de permanencia en heces, mientras que en los huevos liberados durante el tiempo favorable para el desarrollo (a partir del mes de mayo: B5, ..., B8), el porcentaje de eclosiones observado fue superior: 45-55%.

Consecuencia de estas sucesivas liberaciones, tras la aparición de los primeros huevos embrionados a comienzos de mayo (Tabla En.2), se sucedió la formación de miracidios hasta mediados de agosto (Gráf.IIa), produciéndose su eclosión de forma continuada durante el periodo de mayo-agosto (Gráf.IIb). Esta producción de miracidios se mantuvo incluso en las liberaciones muy tardías: ocho meses tras la excreción, la liberación de huevos al agua (12 sept.) originó el desarrollo completo hasta la eclosión en un 32% (B9 en Tabla En.2). De esta forma, el periodo contaminante pudo mantenerse desde mayo hasta la primera semana de noviembre (Gráf.IIb).

Como se indica en Material y Métodos, durante el primer año no se estudió este mes por considerarse dentro del invierno y ser utilizado diciembre como modelo.

Aunque no disponemos de resultados sobre las posibilidades de supervivencia en heces de los huevos excretados en febrero, los datos obtenidos sobre el desarrollo muestran una embrionación

que comienza hacia la primera semana de abril en el primer año, o durante la cuarta en el segundo, alcanzando una cifra similar en ambos (50t-55t) durante la primera o segunda semana de mayo, es lesionando en su totalidad, fundamentalmente a lo largo de mayo en el primer año, y durante mayo y junio en el segundo (Gráf.Fb.I), al igual que se observara en las primeras liberaciones al agua de huevos excretados un mes antes.

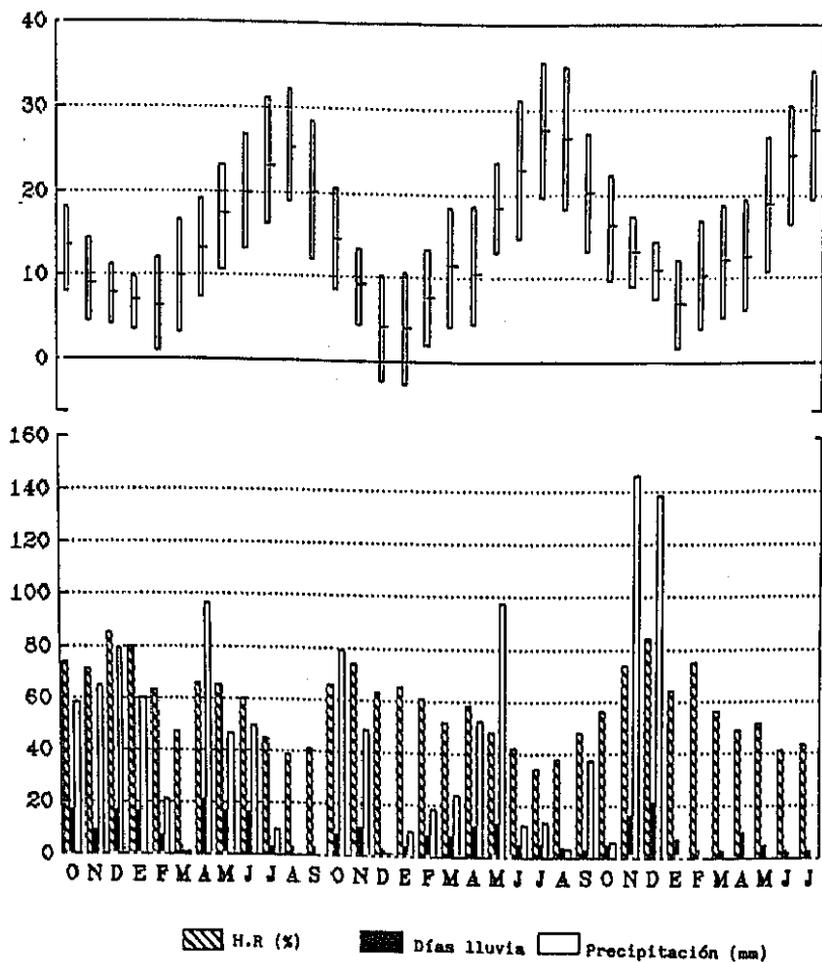


GRAFICO I: Datos meteorológicos registrados en el área de estudio desde octubre de 1987 a julio de 1990.

Tabla Oc.1: Datos sobre el desarrollo de los huevos de *F. hepatica* a T° cte. de 26°C, inmediatamente liberados (C), o tras diferentes tiempos de permanencia en heces excretadas en el mes de octubre y mantenidas a M.R. ambiente (A1,..., A4) o a saturación de agua (B1,...,B8).

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo a 26°C
		Móvil.	Mort.	Emb.	Ecl.	
C	9 oct.	0%	51%	2%	47%	40 días
A1	24 oct.	0%	62%	1%	37%	38 días
B1	24 oct.	0%	80%	0%	20%	38 días
A2	7 nov.	0%	71%	0%	29%	38 días
B2	7 nov.	0%	75%	0%	25%	40 días
A3	21 nov.	0%	73%	0%	27%	38 días
B3	21 nov.	0%	64%	7%	29%	60 días
A4	5 dic.	0%	100%	0%	0%	18 días
B5	2 en.	0%	89%	5%	6%	30 días
B6	31 en.	0%	81%	1%	18%	30 días
B7	27 feb.	0%	85%	0%	14%	42 días
B8	31 mar.	4%	86%	0%	10%	15 días

Tabla Oc.2: Desarrollo de los huevos de F.hepatica excretados en octubre y liberados de heces a saturación de agua en distintos momentos.

HECES EXCRETADAS EN OCTUBRE DE 1988								
MES	SEM	FECHA	C					
OCT.	1ª	9 oct	0% Día Extrac.					
MAR.	2ª	15 mar.	(63%)	0%	0%			
	4ª	31 mar.	(66%)	23%	3%			
ABR.	3ª	21 abr.		6%	0%			
	4ª	28 abr.			3%			
MAY.	1ª	9 may.			16%			
	2ª	16 may	(67%)		1%			
	3ª	22 may.			1%			
	4ª	29 may.			1%			
JUN.	1ª	7 jun.	(71%)		4%			
ESTADO DESARROLLO			Mort. Emb.* Ecl.*		Mort. Emb.* Ecl.*		Mort. Emb.* Ecl.*	
FINAL OBSERVADO			(71%)	(29%)	(90%)	(10%)	(95%)	(5%)

B9		
(80%) Día Extrac.		
	0%	0%
	0%	0%
(90%)	4%	1%
	3%	6%
	3%	3%

B10		
(82%) Día Extrac.		
(95%)	5%	0%
		5%

(): % observado en esa fecha.
 * : % desarrollo puntual entre análisis.

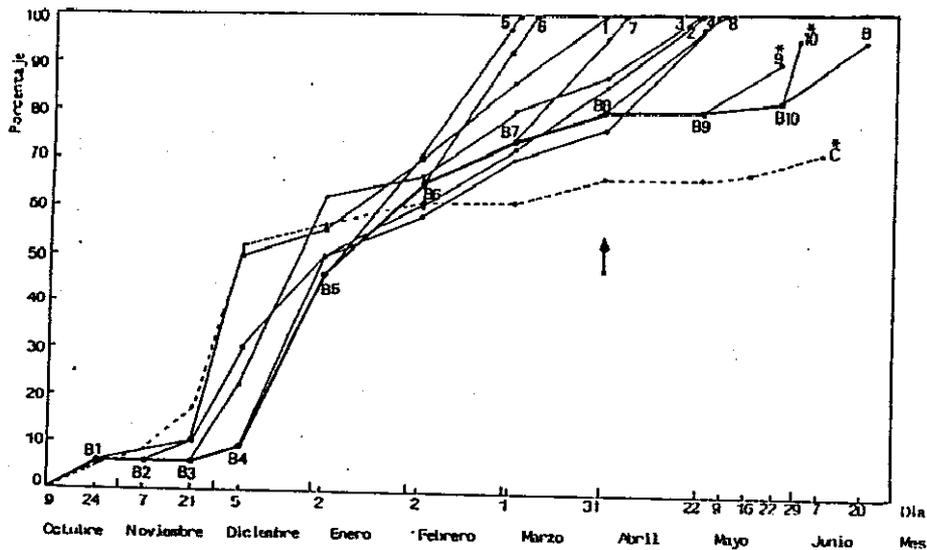


GRAFICO Oc.Ib : Mortalidad de los huevos de *F.hepatica* excretados en octubre e incluidos en heces a saturación de agua (B) o liberados de las mismas a distintos tiempos tras su excreción (B₁ B₁₀).
 † momento a partir del que se observa desarrollo.
 * cultivos en los que existirá desarrollo.

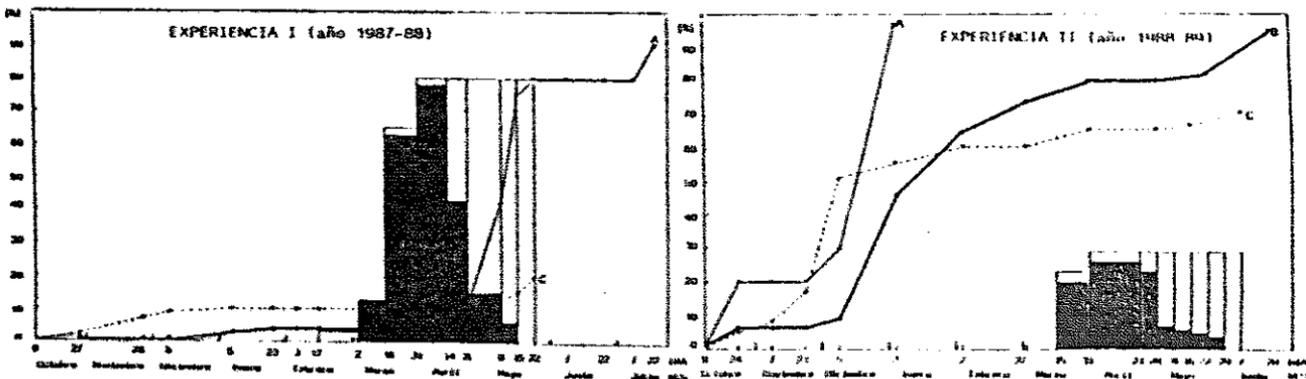


GRAFICO D. II : Desarrollo de los quistes de *F. hepatica* encistados en octubre y liberados de la masa fecal en el momento de su excreción (■ encistados, □ liberados, eclosionados). Datos de mortalidad en agua (C) y en heces a H.R. ambiental (A) y a saturación de agua (B).

Tabla Nv.1: Datos sobre el desarrollo de los huevos de *F.hepatica* a Tª cte. de 26°C, inmediatamente liberados (C), o tras diferentes tiempos de permanencia en heces excretadas en el mes de noviembre y mantenidas a H.R. ambiente (A1, A2) o a saturación de agua (B1, B4,...,B6).

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo a 26°C
		Móvil.	Mort.	Emb.	Ecl.	
C	7 nov.	1%	61%	0%	38%	40 días
A1	21 nov.	0%	68%	3%	29%	40 días
B1	21 nov.	0%	68%	1%	31%	45 días
A2	5 dic.	0%	100%	0%	0%	30 días
B4	2 en.	0%	65%	0%	35%	30 días
B5	31 en.	3%	71%	2%	24%	60 días
B6	27 feb.	0%	61%	4%	35%	30 días

Tabla Nv.2: Desarrollo de los huevos de *L.hispánica* excretados en noviembre y liberados de heces a saturación de agua en diferentes momentos.

HECES EXCRETADAS EN NOVIEMBRE 1988																	
MES	SER	FECHA	C			B5			B6			B7			B8		
NOV.	1*	7 nov.	(0%) Día Extrac.			(40%) Día Extrac.			(55%) Día Extrac.			(70%) Día Extrac.			(74%) Día Extr.		
FEB.	1*	2 feb.	(50%)	0%	0%	(40%)	0%	0%	(55%)	0%	0%	(70%)	0%	0%	(74%)	0%	0%
	4*	27 feb.	(50%)	0%	0%	(40%)	0%	0%	(55%)	0%	0%	(70%)	0%	0%	(74%)	0%	0%
MAR.	4*	31 mar.	(60%)	5%	0%	(83%)	0%	0%	(80%)	0%	0%	(85%)	0%	0%	(85%)	0%	0%
ABR.	4*	28 abr.		7%	0%	(85%)	0%	0%	(85%)	0%	0%		0%	0%	(85%)	0%	0%
MAY.	1*	9 may.		10%	2%		2%	0%		6%	0%		0%	0%		0%	0%
	2*	14 may.		6%	7%		5%	0%		6%	4%		2%	0%		2%	0%
	3*	22 may.		12%	6%		5%	0%		3%	8%		7%	2%		3%	2%
	4*	29 may.			20%		3%	2%			2%		6%	8%		6%	8%
JUN.	1*	5 jun.						2%			1%						
	2*	12 jun.						6%									
	3*	20 jun.						5%									
	4*	28 jun.															
ESTADO DESARROLLO			Mort.	Emb.*	Ecl.*	Mort.	Emb.*	Ecl.*	Mort.	Emb.*	Ecl.*	Mort.	Emb.*	Ecl.*	Mort.	Emb.*	Ecl.*
FINAL OBSERVADO			(60%)	(5%)	(35%)	(83%)		(15%)	(85%)		(15%)	(85%)	(5%)	(10%)	(85%)		(15%)

(*) : observado en esa fecha.

*1 : desarrollo puntual entre análisis.

*2 : miracidios alterados en el interior del huevo.

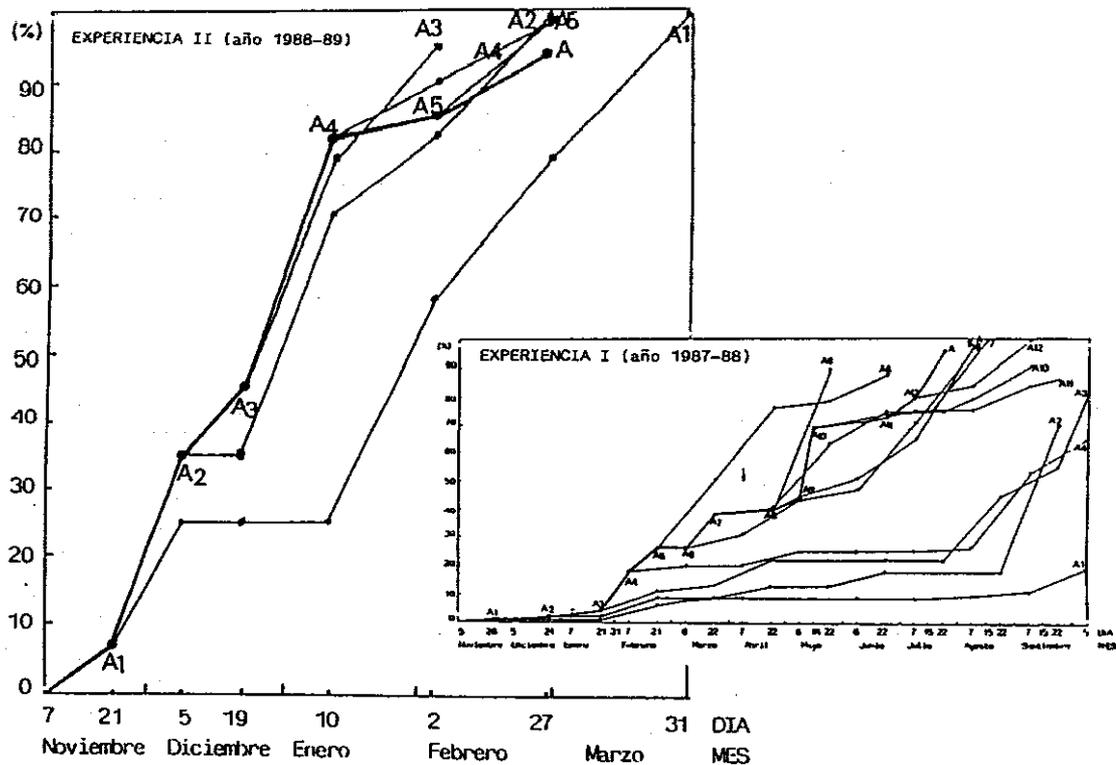


GRAFICO Nv.Ia: Mortalidad de los huevos de *F.hepatica* excretados en noviembre e incluidos en heces a H.R. ambiental (A) o liberados de estas a distintos tiempos tras su excreción (A₁).

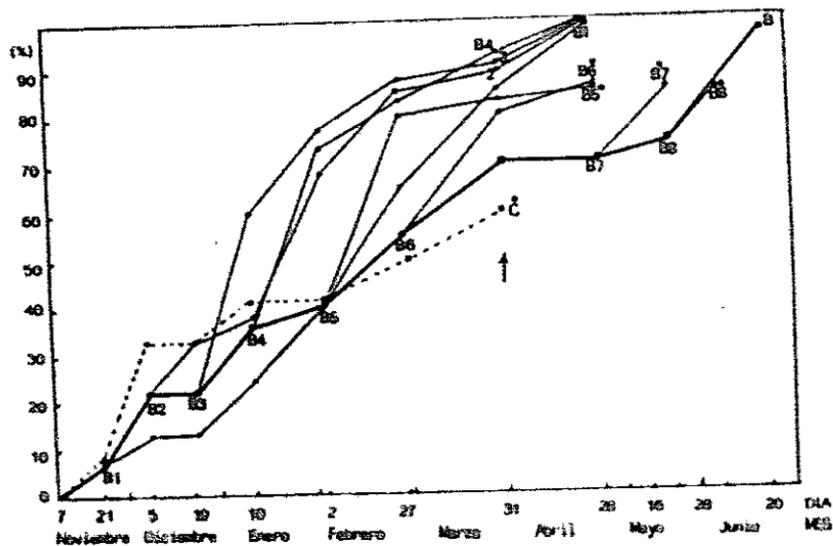


GRAFICO N.º 10 : Mortalidad de los huevos de *F. hepatica* excretados en noviembre e incluidos en heces a saturación de agua (B) o liberados de estas a distintos tiempos tras su excreción (C, B₁ B₈).

↑ momento a partir del cual se observa desarrollo.

* cultivos en los que existirá desarrollo.

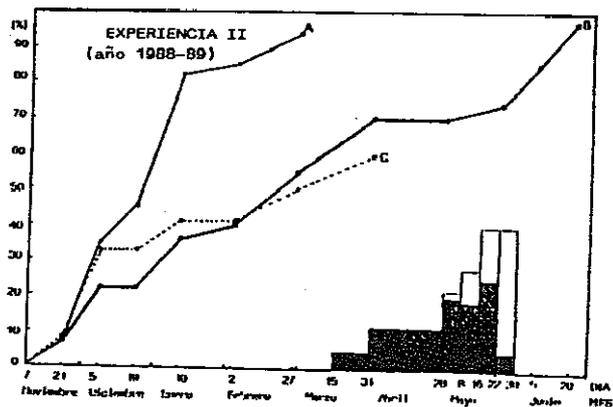
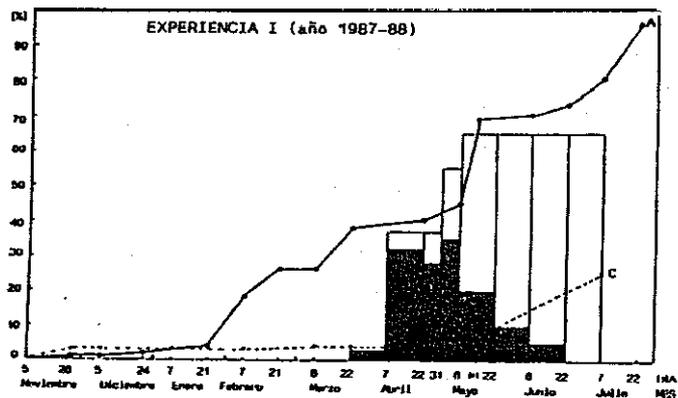


GRAFICO Nv.II : Desarrollo de los huevos de *F.hepatica* excretados en noviembre y liberados de la masa fecal en el momento de su excreción (■) embrionados, □ eclosionados). Datos de mortalidad en agua (C) y en heces a H.R. ambiental (A) y a saturación de agua (B).

Tabla Dc.1: Datos sobre el desarrollo de los huevos de *F. hepatica* a T° cte. de 26°C, inmediatamente liberados (C), o tras diferentes tiempos de permanencia en heces excretadas en el mes de octubre y mantenidas a H.R. ambiente (A1,...,A3) o a saturación de agua (B1,...,B3).

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo incub.
		Móvil.	Mort.	Emb.	Ecl.	
C	4 dic.	7%	41%	0%	52%	58 días
A1	19 dic.	6%	94%	0%	0%	43 días
B1	19 dic.	14%	86%	0%	0%	43 días
A2	2 ener.	5%	95%	0%	0%	29 días
B2	2 ener.	3%	97%	0%	0%	29 días
A3	16 ener.	4%	96%	0%	0%	15 días
B3	16 ener.	7%	93%	0%	0%	40 días

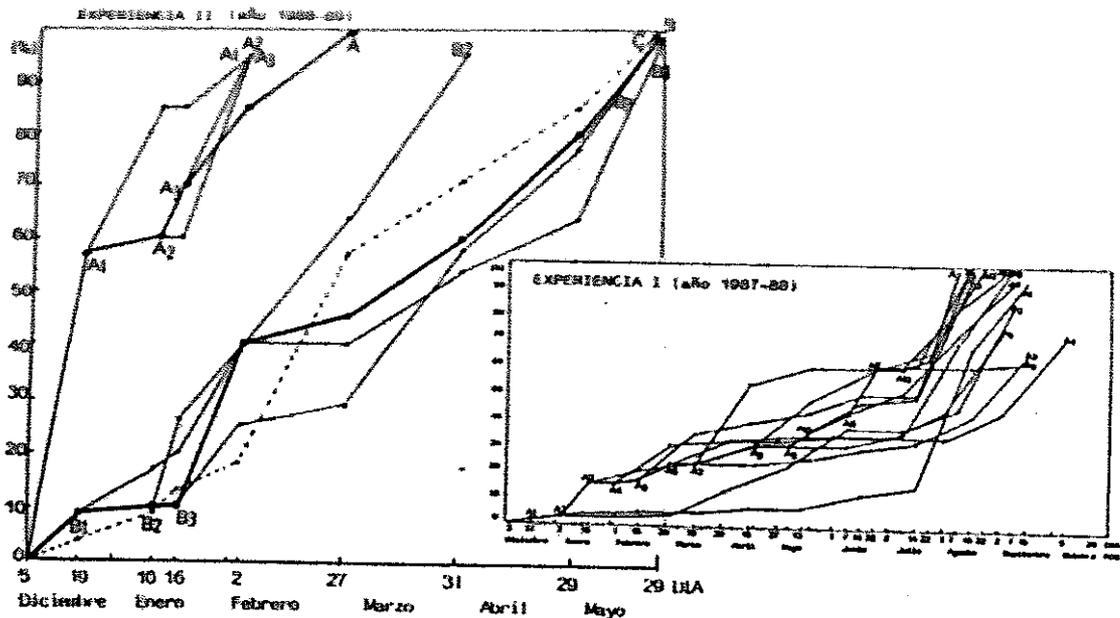


GRAFICO No. 1 : Mortalidad de los huevos de *F. hepatica* excretados en diciembre e incluidos en heces a M.R. ambiental (A) o liberados de las mismas a distintos tiempos tras su excreción (A_1, \dots); o incluidos en heces a saturación de agua (B) y liberados en distintos tiempos (C, B_1, \dots).

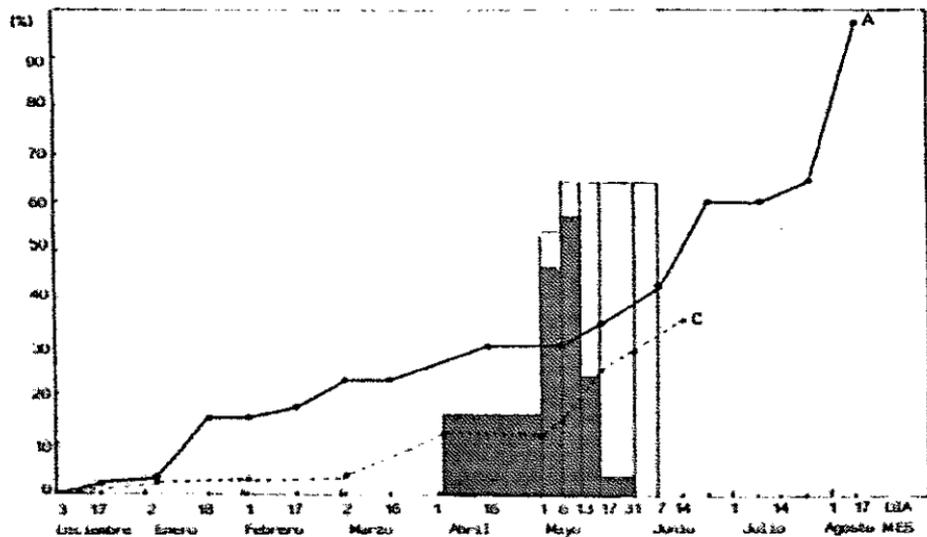


GRAFICO D.11 : Desarrollo de los huevos de *F. hepatica* excretados en diciembre y liberados de la masa fecal en el momento de su excreción (■ embrionados, □ eclosionados). Datos de mortalidad en agua (C) y en heces a H.R. ambiental (A) y a saturación de agua (B).

Tabla En.1: Datos sobre el desarrollo de los huevos de *E.hanatica* a T° cte. de 26°C, inmediatamente liberados (C), o tras diferentes tiempos de permanencia en heces excretadas en el mes de enero y mantenidas a H.R. ambiente (A1,...A3) o a saturación de agua (B1,...B3).

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo a 26°C
		Móvil.	Mort.	Emb.	Eol.	
C	12 en.	0%	11%	11%	78%	30 días
A1	16 en.	5%	54%	10%	31%	60 días
A2	19 en.	3%	87%	0%	10%	60 días
A3	21 en.	0%	100%	0%	0%	60 días
B1	27 en.	0%	29%	1%	70%	30 días
B2	12 feb.	3%	64%	10%	23%	30 días
B3	14 mar.	7%	36%	7%	50%	30 días

Tabla No. 2: Desarrollo de los huevos de *L. hexanota* excretados en enero y liberados de becas a saturación de agua en diferentes momentos.

HECIS EXCRETADOS EN ENERO 1969																		
MES	DIA	FECHA	C			D1			D2			D3						
			1969	1967	1968	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969				
ENE	19	19 ene.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	20	20 ene.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	21	21 ene.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
FEB	20	20 feb.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	21	21 feb.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	22	22 feb.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
MAR	24	24 mar.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 mar.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 mar.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
ABR	24	24 abr.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 abr.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 abr.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
MAY	24	24 may.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 may.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 may.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
JUN	24	24 jun.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 jun.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 jun.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
JUL	24	24 jul.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 jul.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 jul.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
AGO	24	24 ago.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 ago.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 ago.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
SEP	24	24 sep.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 sep.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 sep.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
OCT	24	24 oct.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 oct.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 oct.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
NOV	24	24 nov.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	25	25 nov.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
	26	26 nov.	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	1967	00	00	
DIFER. EXPERIMENTAL	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969
	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969
	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969	1967	1968	1969

(1) = observados en sus focos.
 * = observados durante su desarrollo.
 ** = observados durante su desarrollo en el interior del huevo.

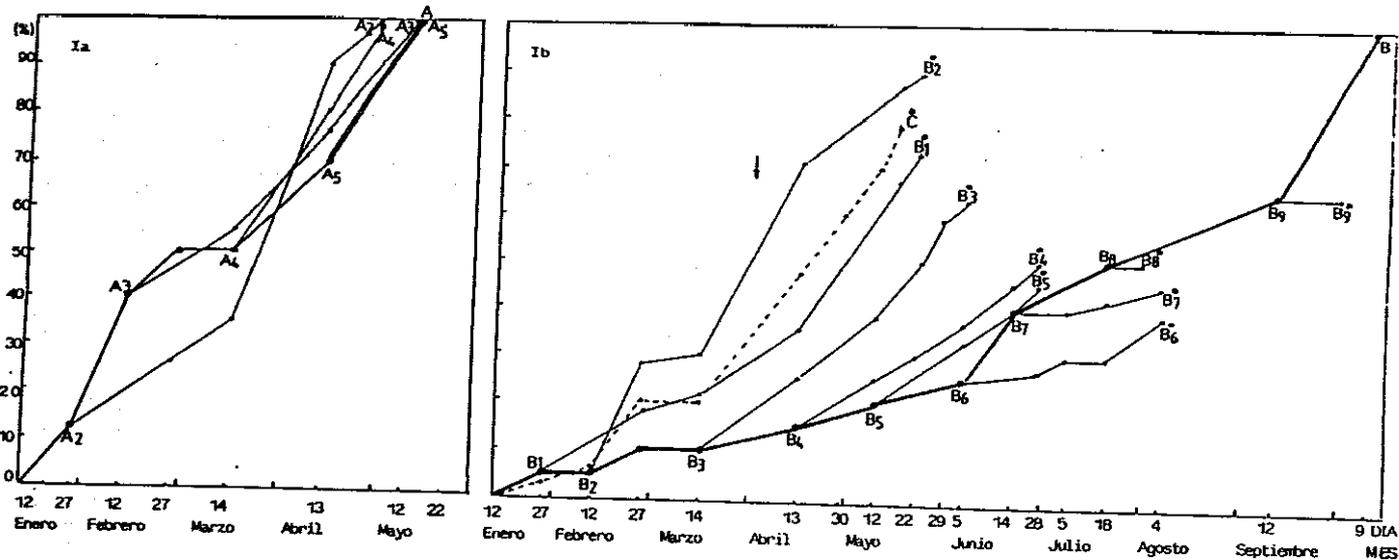


GRAFICO En.I : Mortalidad de los huevos de *F.hepatica* excretados en enero e incluidos en heces a H.R. ambiental (A) o a saturación de agua (B) o liberados de unas o otras a distintos tiempos (C, A₁ ..., B₁).
 † momento a partir del cual se observa desarrollo.
 * cultivos en los que existirá desarrollo.

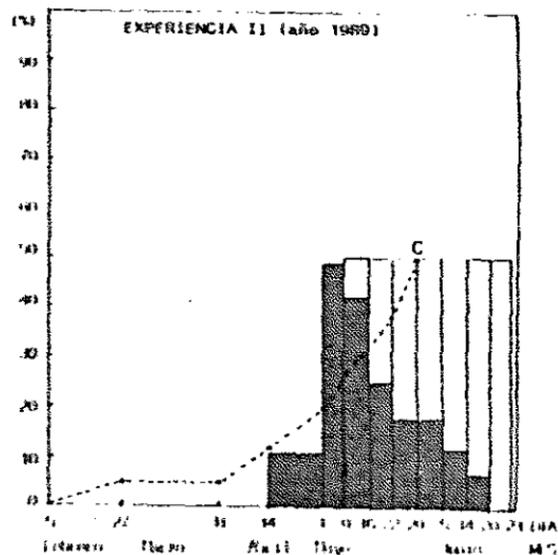
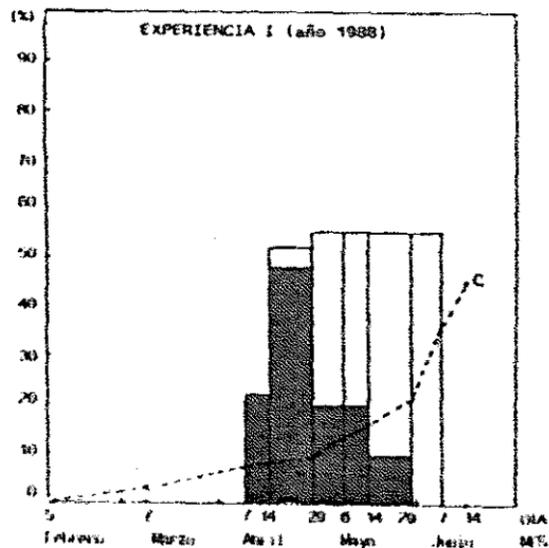


GRAFICO Fb.1 : Desarrollo de los huevos de *F. hepatica* excretados en febrero y liberados de la masa fecal en el momento de su eliminación (--- C mortalidad, ■ Nuevos eclosionados y □ Nuevos eliminados).

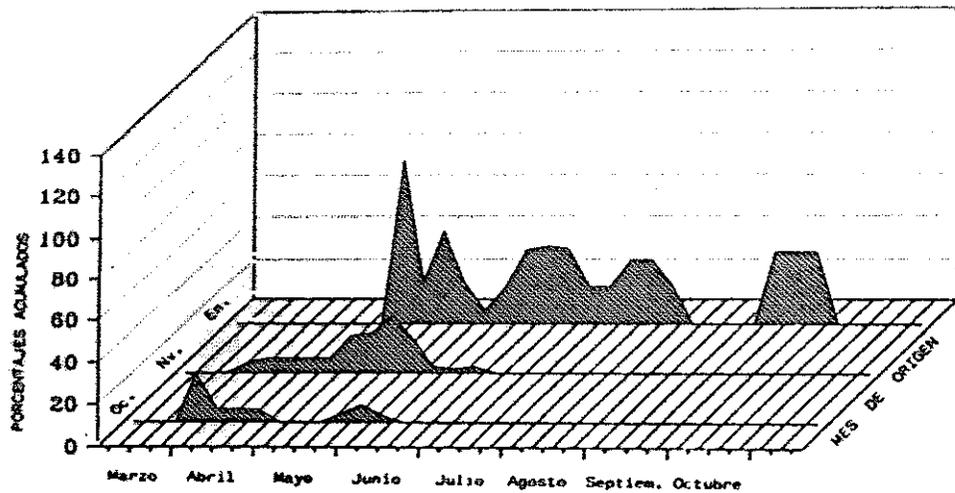


GRAFICO IIa : Periodo de tiempo en el que se observa atravesamiento de los huevos de F.hepatica excretados en otoño e invierno y liberados secuencialmente de las heces.

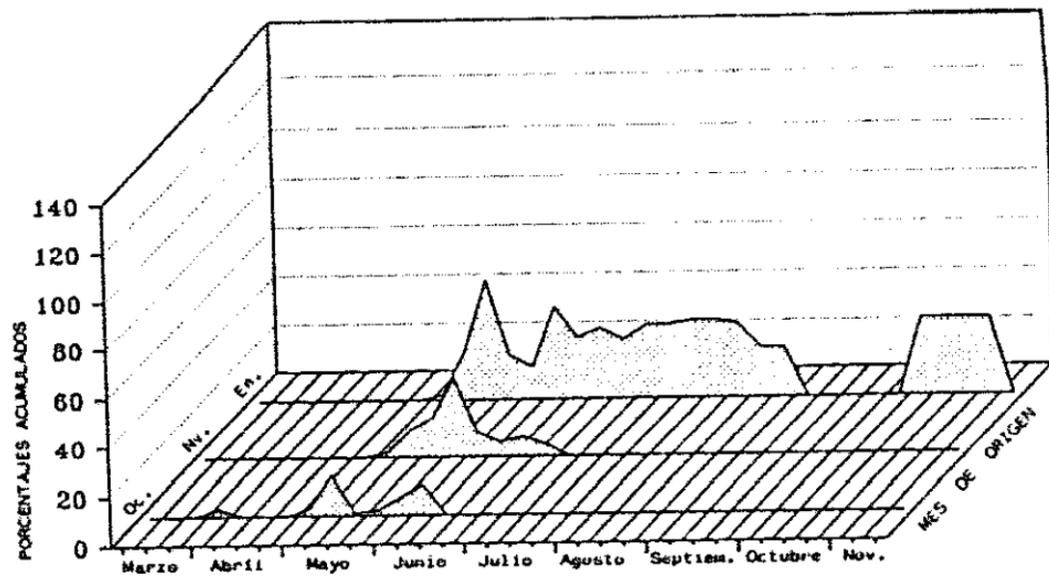


GRAFICO Iib : Período de tiempo en el que se observa eclosión de los huevos de *F.hepatica* que, excretados en otoño e invierno, son liberados secuencialmente de las heces.

3.1.b.- Periodo de temperaturas medias próximas a 10°C (marzo-abril).

El comportamiento mostrado por los huevos excretados durante los meses de marzo y abril, cuyas temperaturas medias se mantuvieron entre valores próximos o algo superiores a los 10°C y en los que las temperaturas mínimas mensuales aún no alcanzaban este umbral (Gráf.I), mantuvo cierta semejanza respecto a lo observado en los precedentes de enero.

Así, en los huevos excretados en marzo en ningún caso se observó desarrollo a T° ambiente tras haber permanecido en las heces bajo a M.R. ambiental aunque, al igual que en los de enero, el deterioro morfológico no afectó a la totalidad de los huevos hasta la primera quincena de mayo en el 2º año (momento en que en el primero afectaba casi al 80%), coincidiendo en éstos con su segundo mes de permanencia en heces (A en Gráf.Mr.I, Exp.I y II).

Por otra parte, la mortalidad total de los huevos en el interior de las heces mantenidas a saturación de agua no se observó hasta finales de agosto, coincidiendo con el sexto mes de permanencia (B en Gráf.Mr.I); periodo algo inferior al apreciado en los precedentes de enero, donde hacia la primera semana de septiembre (en su octavo mes) la supervivencia aún era del 15%.

Como en los precedentes de enero, aunque en todas las liberaciones de huevos de heces mantenidas a saturación de agua se observó desarrollo, los primeros huevos liberados al agua tuvieron menos oportunidades que los que permanecieron menos tiempo en ella hasta la aparición de los primeros embriones. Como puede verse en la Tabla Mr.1, en el cultivo inicial (C) habrían de transcurrir dos meses hasta la aparición de los primeros embriones, mientras que el intervalo se redujo a una-tres semanas en el resto (3 en los liberados en abril (B1 y B2), 2 en los de mayo (B3 y B4) y 1 en los de junio-julio (B5 y B6)). La

alteración de huevos en mórula durante el desarrollo fue también superior en este cultivo (24% en C) que en el resto (9% como máximo en B1, ..., B6).

Consecuencia de todo ello, hubo una proporción muy inferior de huevos embrionados en los extraídos en el día de excreción (20% en C) que en los liberados a los 10 días y con posterioridad hasta finales de junio, donde la cifra osciló entre valores relativamente próximos (B1-B5: 50%-63%) (Tabla Mr.1). Algo similar ocurrió con la eclosión, cuyo porcentaje fue muy parecido al de embrionados en cada cultivo (salvo en B4, donde se produjo un deterioro relativamente importante de huevos totalmente embrionados). A pesar de que los huevos liberados en julio ya presentaban una elevada mortalidad en el momento de su extracción (B6 en Gráf.Mr.1), casi la totalidad de los aún viables completaron su desarrollo hasta la eclosión (B6 en Tabla Mr.1).

De esta forma, y siempre a partir de heces mantenidas a saturación de agua, la contribución de estos huevos con miracidios al medio, que comenzó, como en los excretados durante enero y febrero, hacia la segunda semana de mayo, se prolongó hasta agosto (Tabla Mr.1 y Gráf.IIIa y IIIb).

Debe señalarse la ausencia de desarrollo observada el primer año de nuestro estudio (Exp.I) en los huevos liberados en el día de su excreción (primeros de marzo), a pesar de presentar en todo momento una mayor integridad morfológica que la observada en el cultivo homólogo del segundo año (compárense las Trayectorias C de ambos años en Gráficos Mr.1).

Por su parte, en los huevos excretados en abril y mantenidos en heces bajo condiciones ambientales de T° y H.R. el deterioro morfológico total se produjo, como en los meses precedentes, hacia la primera quincena de mayo (A en Gráf.Ab.1).

En contraste con aquellos, sin embargo, en los homólogos de abril liberados durante los primeros 30 días se obtuvo desarrollo a medio ambiente, aunque en escasa proporción (30% en A1 y 16% en A2). Como se muestra en la Tabla Ab.1, la embrionación comenzaría a primeros de mayo (1ª y 2ª semana, respectivamente, en A1 y A2) y se completó en unas dos semanas, coincidiendo con la aparición de los primeros miracidios libres, eclosiones que se prolongaron hasta la segunda semana de junio.

El comportamiento seguido hasta el comienzo del desarrollo por los huevos liberados de estas heces (mantenidas a H.R ambiente) a los 15 días de su excreción (A1) fue el mismo que el mostrado por los liberados inicialmente (C) o 15 días tras permanecer en heces mantenidas a saturación de agua (B1) (obsérvense sendas trayectorias en Gráf. Ab.I hasta la 2ª sem. mayo). El deterioro experimentado durante el desarrollo por los procedentes de heces mantenidas a H.R. ambiente (aprox. 45% en A1) redujo en mayor medida su contribución con miracidios al medio frente al aporte de los otros dos cultivos, donde el incremento de mortalidad durante el periodo de desarrollo no superó el 30% (33% en C y 23% en B1), según se muestra en la Tabla Ab.1.

Como sucediera en los anteriores meses, las posibilidades de supervivencia de los huevos en heces a saturación de agua superarían a las presentadas por los mantenidos en heces a H.R. ambiente (compárense Trayectorias B y A en Gráf.Ab.I). Por su parte, los huevos liberados tempranamente (primeros 15 días, C y B1) presentaron mayor mortalidad durante el desarrollo que cuando su liberación se produjo en los meses sucesivos (mayo en adelante). De este modo, como se muestra en la Tabla Ab.1, los huevos liberados a partir de mayo apenas presentaron alteración posterior ([0%-13%] en B3, ..., B5) independientemente, además, del orden de extracción, por lo que su porcentaje de eclosión fue dependiente de la mortalidad producida durante su permanencia en

las heces, que acusaría el mayor incremento a partir de junio, durante los meses de julio y agosto (B en Gráf.Ab.I). Así, el mayor aporte de miracidios se obtuvo en las liberaciones de mayo a junio (B2, B3 y B4), asemejándose al obtenido de las liberaciones anteriores (C y E1) al de los liberados entre mediados de julio y de septiembre (B5 y B6), como se muestra en la Tabla Ab.1.

Como era de esperar, los huevos liberados a partir de finales de septiembre (B7 y B8), pese a demostrar capacidad potencial de desarrollo (comprobada por incubación a T^a cte.) en el momento de su extracción, no llegaron a alcanzarlo en condiciones ambientales y el control efectuado en heces hacia la tercera semana de noviembre mostró una total ausencia de viabilidad de los huevos, pese a mantener para entonces su integridad morfológica en un 36% (Gráf.Ab.I).

Los resultados de desarrollo, expuestos en la Tabla Ab.1, muestran una importante liberación de miracidios al medio por parte de los huevos excretados en abril que, como en los de marzo, puede producirse de forma continuada desde mayo hasta finales de agosto y prolongarse hasta la primera semana de noviembre (dos meses más que en los del mes anterior, Gráf.IIIa y IIIb) si la liberación de huevos se mantiene hasta septiembre y siempre que las heces permanezcan a saturación de agua, pudiendo contribuir también durante los primeros meses (mayo y junio) los mantenidos hasta 30 días en heces a H.R. ambiente (posibilidad no observada en las excreciones anteriores).

En la primera Experiencia, como ya se expresó en el Capítulo Material y Métodos, no se estudió el mes de abril, por considerarse climatológicamente incluido en el periodo denominado "Primavera I", eligiéndose el mes de marzo como modelo.

Tabla No. 1: Desarrollo de los huevos de *Xenopus* observados en agua y liberados de huevos a colonización de agua a diferentes tiempos.

HUEVOS OBSERVADOS EN AGUA EN 1968																												
MES	DÍA	HORA	C			B1			B2			B3			B4			B5			B6							
			(264)	04	04	(270)	04	04	(270)	04	04	(274)	24	04	(274) Día Entrac.	04	04	(354) Día Entrac.	14	04	(424) Día Entrac.	24	04	(484) Día Entrac.	24	04		
MAR.	10	4 abr.	(264)	04	04	(270)	04	04	(270)	04	04	(274)	24	04	(274) Día Entrac.													
	20	20 abr.	(264)	04	04	(270)	04	04	(270)	04	04	(274)	24	04	(274) Día Entrac.													
	30	8 may.	(264)	74	04	(270)	124	04	(270)	124	04	(274)	24	04	(274) Día Entrac.													
MAY.	20	24 may.	(264)	04	04	(270)	264	04	(270)	264	04	(274)	24	04	(274) Día Entrac.													
	24	22 may.	(264)	04	04	(270)	284	264	(270)	284	264	(274)	24	04	(274) Día Entrac.													
	4*	29 may.		74	74		74	124		74	124		24	04	(274) Día Entrac.													
JUN.	14	8 jun.		44	24		24	44		24	44		24	04	(274) Día Entrac.													
	24	24 jun.			74			104			104		24	04	(274) Día Entrac.													
	30	30 jun.			74								24	04	(274) Día Entrac.													
JUL.	4*	24 jun.											24	04	(274) Día Entrac.													
	14	8 jul.											24	04	(274) Día Entrac.													
	24	22 jul.											24	04	(274) Día Entrac.													
AGO.	30	14 ago.											24	04	(274) Día Entrac.													
	4*	29 jul.											24	04	(274) Día Entrac.													
	24	14 ago.											24	04	(274) Día Entrac.													
ESTADO DESARROLLO	Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *		Mort. Emb. + Ecl. *			
FINAL OBSERVADO	(264)		(264)		(270)		(270)		(270)		(274)		(274)		(274)		(274)		(354)		(424)		(484)		(484)			

(*) : * observado en esa fecha.
 *) : * desarrollo puntual entre análisis.
 *) : * mirasidios alterados en el interior del huevo.

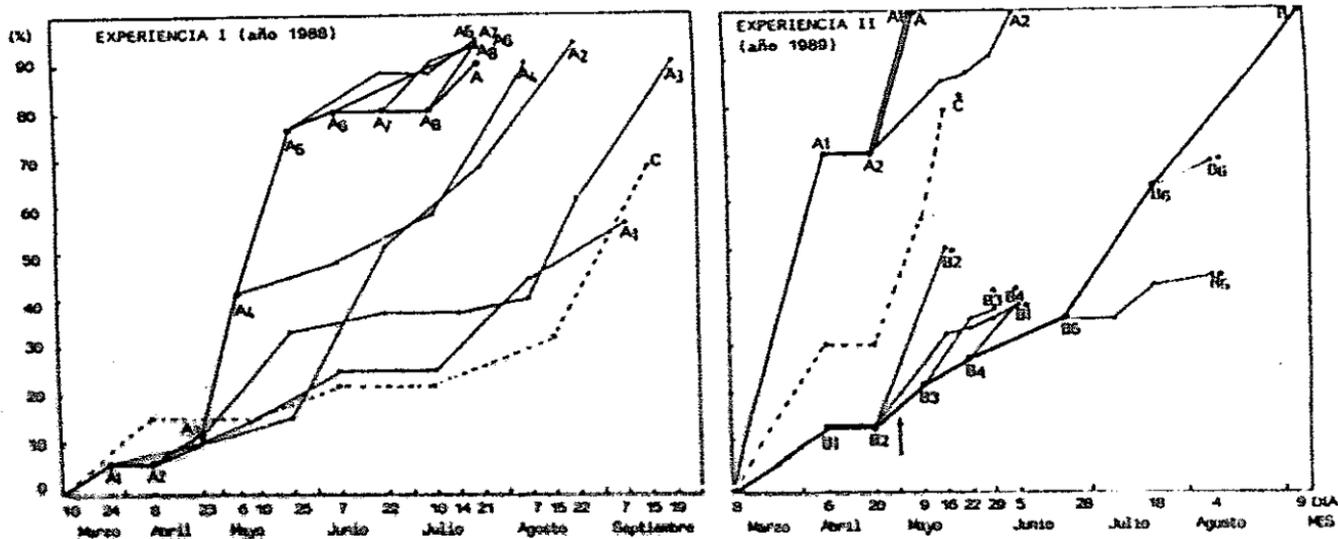


GRAFICO No. I : Mortalidad de los huevos de *F. hepatica* excretados en marzo e incluidos en heces a H₂O ambiental (A) o liberados de setas a distintos tiempos tras su excreción (A₁ ...) e incluidos en heces a saturación de agua (B) o liberados de setas a distintos tiempos (B₁).

Tabla Ab.1: Desarrollo de los huevos de *E. hepatica* excretados en abril y mantenidas en heces a humedad relativa ambiente (A1..) o a saturación de agua (C, B1....) durante diferentes periodos de tiempo.

HECES EXCRETADAS EN ABRIL 1959																											
MES	SEM. FECHA		C			B1			B2			B3			B4			B5			B6						
	10	7 Abr.	(194) Dia Extrac.	08	06	(244) Dia Extrac.	08	06	(400) Dia Extrac.	08	06	(284) Dia Extrac.	08	06	(78) Dia Extrac.	08	06	(284) Dia Extrac.	08	06	(284) Dia Extrac.	08	06	(504) Dia Extrac.	08	06	
ABR.	30	21 Abr.	(203)	283	06	(284)	174	08	(224)	244	06	(284)	164	06													
	10	9 May.	(203)	283	06	(284)	174	08	(224)	244	06	(284)	164	06													
	30	28 May.	(404)	334	24	(424)	334	24	(304)	224	06	(204)	224	06													
MAY.	30	22 May.	(444)	274		(424)	224		(254)	224		(254)	224		(74)	224											
	40	20 May.	(534)	204		(424)	224		(254)	224		(254)	224		(74)	224											
	10	5 Jun.				(704)	44		(244)	224		(254)	224		(84)	244											
JUN.	20	14 Jun.					84			44		(224)	204		(264)	84	224	(284) Dia Extrac.	(254)	08	06						
	30	20 Jun.								34			204		(264)	84	224	(284) Dia Extrac.	(254)	08	06						
	40	28 Jun.								44			204		(264)	84	224	(284) Dia Extrac.	(254)	08	06						
JUL.	10	3 Jul.																									
	30	28 Jul.																									
	40	28 Jul.																									
AGO.	20	4 ago.																									
	30	14 ago.																									
	30	21 ago.																									
SEP.	10	9 sep.																									
	10	9 oct.																									
OCT.	10	9 oct.																									
	30	23 oct.																									
NOV.	10	9 nov.																									

(1) : observado en esa fecha.
 * : desarrollo puntual entre analisis.
 * : miraciones alterados en el interior del huevo.

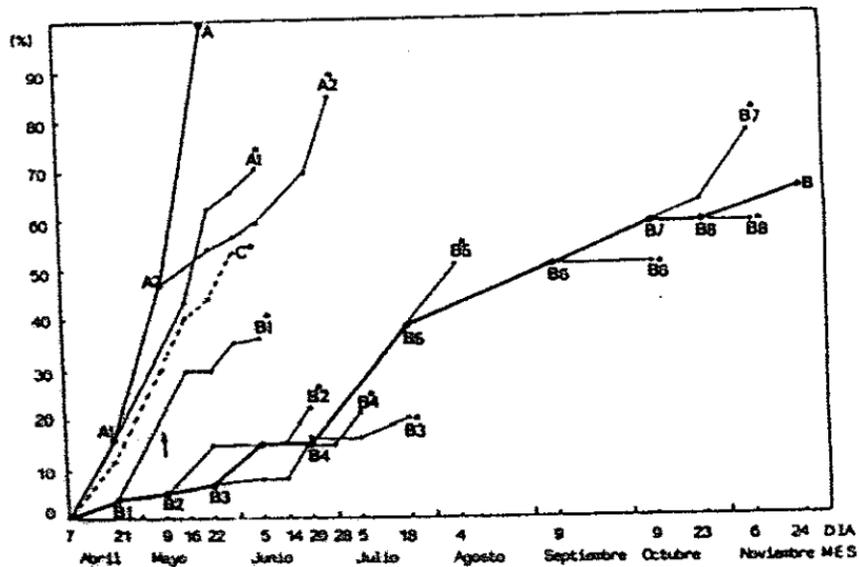


GRAFICO Ab.I : Mortalidad de los huevos de *F.hepatica* excretados en abril e incluidos en beces a H.R. ambiental (A) o a saturación de agua (B) o liberados de unas o las otras en distintos tiempos (A₁ C, B₁).
 ↑ momentos a partir del cual se observa desarrollo.
 *cultivos en los que se observará desarrollo.

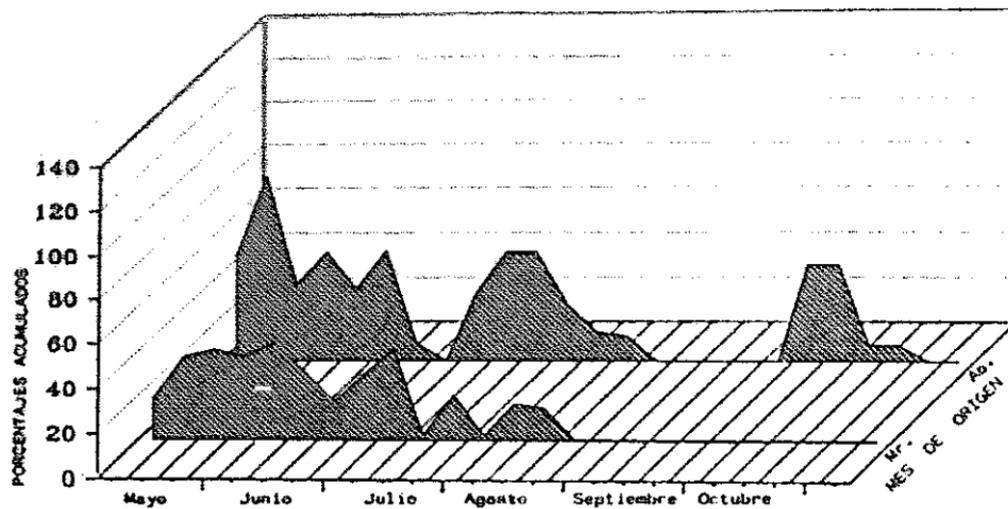


GRAFICO IIIa : Periodo de tiempo en el que se observa embrionación de los huevos de *F. hepatica* que, excretados en marzo y abril, son liberados secuencialmente de las heces.

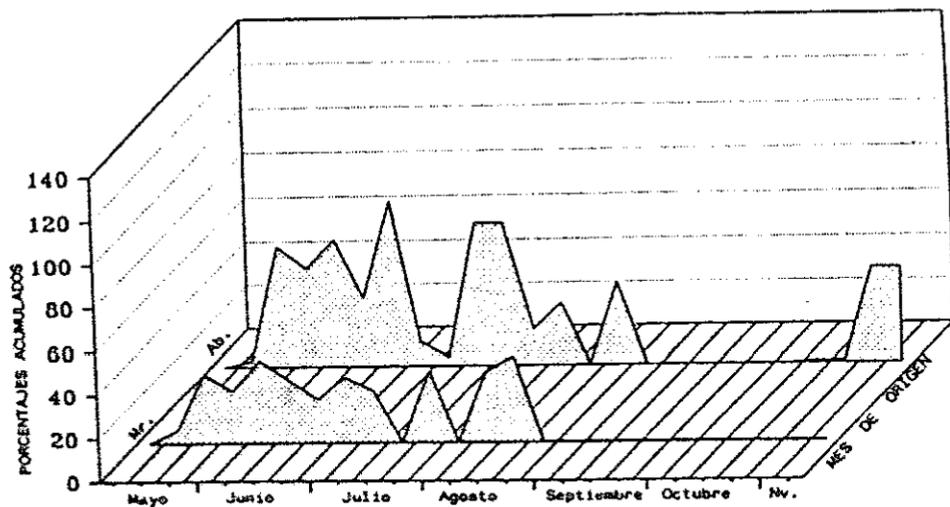


GRAFICO IIIb : Periodo de tiempo en el que se observa eclosión de los huevos de *F.hepatica* que, excretados en marzo y abril, son liberados secuencialmente de las heces.

3.1.c.- Periodo de temperaturas mínimas superiores a 10°C. (mayo a septiembre)

Durante el periodo térmico considerado favorable para el desarrollo, dentro del cual y en las condiciones meteorológicas de Madrid pueden incluirse los meses de mayo a septiembre, en los que las temperaturas mínimas mensuales se sitúan por encima de los 10°C y las medias en el rango 15-28°C (Gráf.I), la supervivencia de los huevos en el interior de las heces mantenidas a H.R. ambiente fue prácticamente nula en todos los casos, salvo en los excretados en septiembre, presentándose dentro de este mismo periodo una desigual capacidad de resistencia en el interior de las heces que fueron mantenidas al 100% de H.R., como expondremos a continuación.

En la eliminación de mayo, los huevos mantenidos en heces a H.R. ambiente no superaron este mes (tampoco los excretados en marzo y abril), observándose un absoluto deterioro morfológico ya a los 11 días de permanencia (Trayectoria A en Gráf. My.I). En los liberados a los 3 días de la masa fecal el desarrollo fue nulo incluso a T₁ etc. La única posibilidad de desarrollo para estos huevos fue su liberación anterior a los tres primeros días, tras la que, con una mortalidad inicial del 35%, éste se completó hasta la eclosión en un 45% (A₀ en Gráf.My.I).

Elevados porcentajes de eclosión (75%-61%) alcanzaron los huevos liberados, inmediatamente tras su excreción o sucesivamente durante los dos meses siguientes, de la materia fecal mantenida a saturación de agua (C,B1,...,B5 en Gráf.My.I), observándose miracidios móviles en el huevo ya a la semana de su liberación al agua, con extensión similar en los periodos de maduración y eclosión (unas cuatro semanas) en todos los casos, como se muestra en la Tabla My.1.

El comportamiento comenzaría a diferenciarse cuando la

permanencia en estas heces superó los dos meses y medio, como se observó en las extracciones realizadas a comienzos de agosto y de septiembre (B6 y B7), donde se produjo una mayor destrucción de huevos en mórula durante el periodo de desarrollo (Tabla My.1) que, unida a la mayor mortalidad existente en las heces (B. en Gráf.My.I), redujo las posibilidades de eclosión al 40%. Liberación de miracidios que se inició a mediados de agosto en los extraídos ese mes y no comenzó hasta bien avanzado octubre en los liberados en septiembre (B6 y B7 en Tabla My.1).

Tras la primera semana de septiembre, los huevos que aún permanecían en heces desde su excreción en mayo acusaron un nuevo incremento de mortalidad: 30% en el periodo de un mes (B en Gráf.My.I), quedando desde octubre a enero un 15%-30% de huevos morfológicamente íntegros y potencialmente capaces de desarrollarse, como demostrara su eclosión en los respectivos controles a T^a cte, según la Tabla siguiente:

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo incub.
		Mórul.	Mort.	Emb.	Ecl.	
B8	24 nov	0%	85%	2%	13%	40 días
B9	10 ene	0%	67%	6%	27%	40 días
B10	9 feb	10%	90%	0%	0%	15 días

Tales resultados indican que, si bien la permanencia durante más de tres días en heces a H.R. ambiente comporta nulas posibilidades de desarrollo en los huevos excretados en mayo, su liberación inmediata o progresiva de heces mantenidas a saturación de agua, al menos, hasta primeros de septiembre puede provocar una constante contaminación de los hábitats con miracidios desde comienzos de junio hasta finales de octubre-primer semana de noviembre (Gráf.IVb) por sucesiva embriónación entre finales de mayo y octubre (Gráf.IVa)

En la Experiencia I el mes de mayo se incluyó en el periodo denominado "Primavera II" junto con junio, siendo este último el estudiado.

En las excreciones de huevos en junio, puesto que el deterioro producido en el interior de las heces, mantenidas bajo condiciones ambientales de T^a y H.R., fue total a los 8 días (A en Gráf.Jn.I, Exp.II), el desarrollo dependería de su rápida liberación al agua (C) o antes de la 5ª semana de permanencia en heces al 100% de H.R. (B1,...,B3). A partir del 5 de julio se produjo un rápido deterioro de los huevos en estas heces, pasando la mortalidad de un 10% al 60% en 15 días, y a casi el 100% hacia mediados de agosto. Rápida alteración de la que tampoco escaparían los liberados al agua en estos meses, adelantándose incluso su destrucción (compárense las trayectorias B y B4 en Gráf.Jn.I, Exp.II).

Como se muestra en la tabla Jn.1, la aclosión mantuvo elevados porcentajes (70%-80%) en las sucesivas liberaciones efectuadas durante el primer mes (C,B1,B2 y B3). El grado de deterioro en fase de mórula observado durante el periodo de desarrollo fue relativo al orden de su extracción de las heces, en contraste con lo observado en los meses anteriores, representando sólo un 5% en los liberados tras su excreción (C) mientras que en los liberados al mes (B3), últimos con posibilidades de desarrollo, supuso un 20%. Como sucediera en mayo, los primeros miracidios completamente desarrollados en el interior del huevo se observaron ya a la semana de su liberación al agua, transcurriendo en general las embrionaciones durante unas 3-4 semanas (Tabla Jn.1).

En nuestros resultados, la contribución de estos huevos con miracidios al medio, consecuencia de su liberación progresiva de las heces mantenidas a saturación de agua y con un límite de permanencia de un mes, se produjo desde mediados de junio hasta la tercera semana de agosto (Gráf.IVb).

Los resultados obtenidos con los huevos excretados en junio durante el primer año (Exp.I) difieren, sin embargo, de los del segundo (Exp.II), demorándose el deterioro morfológico total de los huevos en heces a H.R. ambiente hasta agosto (compárense Trayectorias A en Gráf.Jn.I, Exp.I y II), aunque ninguna liberación al agua supuso desarrollo alguno para estos huevos. sólo experimentaron embrionación los extraídos tras la excreción (C en Gráf.Jn.II, Exp.I), retrasándose su inicio un mes respecto del segundo año (2ª sem. jun. en el segundo año, 2ª-3ª sem. jul en el primero) y completándose sólo en un 14% de los huevos, frente a un 80% de eclosión en el segundo (ver desarrollo en gráfico Jn.II, Exp.I y II), pese a presentar estos huevos un aparente deterioro no superior al 10% al iniciarse la embrionación, observándose las últimas eclosiones a finales de septiembre.

Al igual que sucediera con los huevos eliminados un mes antes, las posibilidades de supervivencia de los excretados en julio en heces mantenidas a H.R. ambiente fueron nulas, mostrando también un total deterioro morfológico a los 7 días (A en Gráf.Jl.I, Exp.II).

Del mismo modo se observó una resistencia nula a las temperaturas de julio en los huevos mantenidos en heces con humedad a saturación (B en Gráf.Jl.I, Exp.II), en los que la mortalidad fue casi total (90%) también hacia mediados de agosto. La liberación de estos huevos al agua a partir de la semana de ser excretados aceleraría incluso su destrucción (B1 y B2 en Gráf.Jl.I, Exp.II) reduciendo al mínimo sus posibilidades de desarrollo, que no llegó a producirse en los liberados hacia el 10 jul. (B1) ni superó el 10% en los extraídos 9 días después (B2).

Sólo los huevos liberados inmediatamente tras su excreción

(C), únicos en nuestro estudio capaces de sobrevivir a las temperaturas de julio, alcanzarían un rápido desarrollo en un porcentaje importante (65%), como se muestra en el Gráfico J1.I (Exp.II) y en la Tabla J1.1. Así, ya a la semana de liberación aparecieron huevos totalmente embrionados, observándose las últimas embrionaciones a las cuatro semanas (Gráf.Va), en tanto que la eclosión, que comenzó con sólo una semana de desfase, se extendería hasta la tercera semana de agosto (Gráf.Vb). Por tanto, la contribución con miracidios al medio por parte de los huevos excretados en julio podría producirse ya desde mediados de dicho mes y a lo largo de unas cinco semanas (hasta la tercera de agosto en nuestros resultados), mas sólo si su liberación al agua fuese inmediata tras su excreción.

En la experiencia equivalente a esta mes llevada a cabo durante el primer año (Exp.I), como en los meses anteriores, el deterioro morfológico de los huevos en heces a H.R. ambiente mantuvo un ritmo más lento que en el segundo (Exp.II) aunque el desarrollo tras su liberación al agua fue nulo. Por su parte, el observado en los liberados inmediatamente tras su excreción fue cuantitativamente próximo al presentado en el cultivo homólogo del segundo año (ver desarrollo en C en Gráf.J1.I, Exp.I y II), si bien la embrionación no comenzó hasta la tercera semana post-excreción y se extendió, como la eclosión, durante más tiempo, produciéndose el aporte de miracidios casi a todo lo largo de agosto y de septiembre (Gráf. J1.I, Exp.I).

Sin salirse de la tónica mantenida durante los anteriores meses de verano el deterioro producido en el interior de las heces expuestas a las condiciones de H.R. y T^a ambientales cuando los huevos se excretaron en agosto fue rapidísimo, afectando al 100% de los huevos en 6 días (A en gráf.Ag.I).

Por el contrario, los excretados en agosto mantenidos en heces con humedad a saturación mostraron una supervivencia mucho

mayor que la presentada por los de junio y julio (en los que la mortalidad fue total hacia mediados de agosto) y, por tanto, un comportamiento más próximo al de los excretados en primavera (B en Gráf.Ag.I). Así, la mortalidad existente hacia mediados de agosto en los excretados en ese mismo mes y mantenidos en heces a saturación de agua (12%) sólo se incrementó sensiblemente durante los meses de septiembre (incremento del 14%) y diciembre (incremento del 15%). De esta forma, como se muestra en el mismo gráfico, aproximadamente un 50% de los huevos que permanecieron hasta entonces en heces conservaría durante enero y febrero su integridad morfológica y una cierta capacidad de desarrollo corroborada por los controles de viabilidad a Tª cta., como se indica en la Tabla expuesta a continuación:

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo incub.
		Mócul.	Mort.	Emb.	Ecl.	
B7	24 nov	0%	85%	2%	13%	40 días
B8	10 ene	0%	67%	6%	27%	40 días
B9	9 feb	0%	90%	0%	10%	15 días

Sólo hubo desarrollo en ese año a medio ambiente en los huevos liberados paulatinamente desde el momento de su excreción (C) hasta la primera semana de septiembre (B1,...,B4), como se muestra en la Tabla Ag.1. Tales huevos mostraron comportamientos similares, con independencia del momento de su liberación, alcanzando una mortalidad en mórula de un 22%-30% producida en su mayor parte, en los huevos liberados de las heces en agosto (C,B1,...,B3) durante el periodo de embrionación hasta la salida de los primeros miracidios al agua (Tabla Ag.1) y en los extraídos en septiembre (B4), durante su permanencia en las heces (Gráf.Ag.I y Tabla Ag.1).

Las liberaciones efectuadas un mes más tarde (9 y 23 oct.) no comportaron desarrollo alguno bajo condiciones ambientales y aceleraron además el deterioro de los huevos (incremento del 20%)

frente a la resistencia mantenida durante ese periodo en el interior de las heces a saturación de agua (compárense trayectorias B5 y B6 con B en octubre, Gráf.Ag.I).

La embrionación de los huevos eliminados en agosto se inició, como en los excretados en julio, a la semana de su liberación al agua, produciéndose una semana más tarde las primeras eclosiones (Tabla Ag.1). El aporte de miracidios se produjo sucesivamente desde mediados de agosto a primeros de noviembre, como resultado de la progresiva liberación de huevos, mantenidos en heces al 100% de humedad, desde el día de su excreción (primeros de agosto) hasta las primeras semanas de septiembre, tal como se indica en los Gráf.Va. y Vb.

En la Experiencia llevada a cabo el año anterior, la liberación de miracidios al agua de los huevos extraídos inmediatamente tras su excreción (C) comenzó también hacia mediados de agosto, una semana después de la observación de los primeros embriones, manteniéndose en éstos hasta la 3ª semana de octubre. La proporción de huevos que completaron su desarrollo (18%) fue, sin embargo, mucho menor (compárese desarrollo en C de ambos años en Gráf.Ag.II, Exp.I y II).

La resistencia de los huevos eliminados en septiembre mantenidos en heces expuestas a H.R. ambiente fue notablemente superior a la presentada por los excretados entre mayo y agosto, sin alcanzar su total mortalidad hasta los 35 días (A en Gráf.Sp.I), 10 días menos que en los de abril y, como en estos, mostrando capacidad de desarrollo a medio ambiente tras haber permanecido incluso 25 días en estas condiciones (A1 y A2 en Gráf.Sp.I y Tabla Sp.1).

De los huevos excretados en septiembre, como se muestra en la Tabla Sp.1, sólo completarían su desarrollo hasta la eclosión, dentro del mismo año, los liberados al agua durante la primera

quincena del mes, de heces tanto a H.R. ambiente como a saturación de agua (C: 5 sept.; A1 y B1: 12 sept.). Los liberados con posterioridad, pese a iniciar su desarrollo, no lo completaron hasta el año siguiente.

La embrionación comenzaría durante la última semana de septiembre en los huevos liberados en la primera quincena del mismo (C, A1 y B1), iniciándose las eclosiones una semana después y extendiéndose a lo largo del mes de octubre y parte de noviembre, al igual que vino sucediendo con las extracciones, realizadas por estas mismas fechas (9-12 sept.), de las heces excretadas en meses anteriores (~~enero~~, ~~abril~~, ~~mayo~~ y ~~agosto~~) y mantenidas a saturación de agua (ver Tablas correspondientes). De los excretados en septiembre, el porcentaje de huevos que llegaron a eclosionar fue menor en los inicialmente liberados que en los que lo fueron 7 días después, consecuencia de la mayor mortalidad producida hasta el comienzo del desarrollo (50% en C, 33% en A1 y 25% en B1) y de un importante deterioro de huevos ya embrionados (22%) que no se presentó en los liberados una semana más tarde (ver Tabla Sp.1).

Aquellas extracciones realizadas a la 3ª semana de permanencia en heces a H.R. ambiente (A2, 29 sept) o entre la 3ª y la 5ª semana en los mantenidos en heces a saturación de agua (B2, 29 sept. y B3, 9 oct.) aún proporcionaron a los huevos la posibilidad de completar su embrionación dentro del mismo año hasta la primera semana de noviembre, produciéndose durante este mes un porcentaje variable de eclosiones (11%-53%) que se interrumpirían a mediados del mismo, quedando aún una cantidad residual (10%-23%) de miracidios en el interior del huevo (mayor en los últimos liberados) que entraron en hibernación, eclosionando durante la primavera del año siguiente, principalmente entre la 3ª sem. marzo y la 3ª sem. mayo (A2, B2 y B3 en Tabla Sp.1). Así, la totalidad de huevos embrionados llegaron a eclosionar en uno u otro momento (otoño o primavera

siguiente); eclosión que fue mayor (68%) en los liberados a la 1ª semana de permanencia en heces a saturación de agua (B2) que en sus homólogos a humedad relativa ambiente (38% en A2) o en los liberados de aquellas heces dos semanas después (34% en B3).

Las liberaciones efectuadas a finales de octubre, coincidiendo con la 7ª semana de permanencia en heces mantenidas a saturación de agua (B4) comportarían posibilidades de embrionación prácticamente nulas (3%) durante ese mismo año debido a que, como ya hemos expuesto, la embrionación se interrumpió hacia la 1ª semana de noviembre y la eclosión una semana después (Tabla Sp.1). Desarrollo que estos huevos alcanzaron, sin embargo, entre mediados de abril y mayo siguientes, eclosionando a lo largo de este último mes (B4 en Tabla Sp.1), aunque en sólo un 20%, pese a mostrar un aparentemente escaso deterioro durante el invierno (su integridad morfológica al comienzo de la primavera era aún de un 45%), según B4 en Gráf.Sp.I.

Nuestros resultados indican que la contribución con miracidios al medio procedente de huevos excretados en septiembre podría suceder durante el mismo año sólo en los huevos liberados antes de concluir la época estival (hasta la 3ª sem sept), en cuyo caso se produciría entre octubre y primera quincena de noviembre (Gráf.Vb). Los liberados con posterioridad entrarían en hibernación, bien como huevos ya embrionados (los liberados antes de la 3ª sem. oct.: A2, B2 y B3 en Tabla Sp.1) que alcanzarían su eclosión durante la primavera siguiente (marzo a mayo), bien en fase de mórula (los liberados con posterioridad) que, aunque con menores posibilidades de éxito, también experimentarían desarrollo hasta la eclosión en la primavera del año siguiente (abril-mayo) (B4 en Tabla Sp.1).

Desconocemos lo ocurrido con los huevos que, excretados en septiembre, permanecieron en heces a saturación de agua durante

el invierno, pero los controles de viabilidad efectuados hasta febrero (Tabla Sp.2) mostraron un mantenimiento de su capacidad de desarrollo en porcentaje similar (20%) al de huevos que, tras su liberación e hibernación en el agua en fase de mórula, lo alcanzaron bajo condiciones ambientales (B4). Esto podría sugerir similares posibilidades de hibernación en heces bajo estas condiciones aunque, como ya se indicó en la primera parte de este capítulo, en los huevos excretados durante el otoño (octubre-diciembre) y mantenidos en heces bajo estas mismas condiciones de humedad (100%) hasta llegar la época favorable, el desarrollo fue muy escaso (en ningún caso superó el 15%) y sólo se obtuvo en las liberaciones realizadas ya muy avanzado el invierno (a partir de febrero-marzo).

En la experiencia correspondiente al mes de septiembre llevada a cabo durante el primer año (Exp.I), en los huevos liberados en el momento de su excreción, pese a adelantarse el periodo de embrionación (3ª sem. sept.- 1ª sem. oct.) y el inicio de la eclosión (4ª sem. sept) con respecto a las fechas apreciadas en su homólogo del segundo año (ver desarrollo en C en Gráf.Sp.II, Exp. I y II), las eclosiones finalizaron hacia la primera semana de noviembre (tres semanas más tarde que en la segunda Experiencia) sin haberse producido la liberación de todos los miracidios (31%). Quedaría, desde entonces, un porcentaje residual (12%) de embriones aún activos dentro del huevo (a diferencia del deterioro producido en los miracidios del segundo año) que no llegaron a eclosionar en el tiempo en que se la observación se mantuvo (hasta finales de diciembre). Como se observara en algunos cultivos de la Exp.II., es posible que la eclosión de los del primer año pudiera completarse en la primavera siguiente.

Por último debemos indicar, como ya se expuso en el capítulo Material y Métodos, que en aquellas extracciones realizadas en la 2ª Experiencia durante los meses con riesgo de heladas inminentes

(octubre-enero) o de temperaturas excesivamente elevadas (julio-agosto) se efectuaron réplicas de todos los cultivos en recipientes destapados sin observarse diferencias importantes en porcentajes ni velocidades de desarrollo con los mantenidos cerrados. sólo en las liberaciones procedentes de heces mantenidas en condiciones óptimas de H.R. (100%) efectuadas durante los meses de octubre-diciembre pudo apreciarse una aceleración del deterioro en los cultivos efectuados en recipientes sin tapadera, adelantándose generalmente su agotamiento respecto al de sus homólogos tapados en unas 4-6 semanas.

Tabla No. 1: Desarrollo de los huevos de *E. hepatica* excretados en heces y liberados de heces a saturación de agua a diferentes tiempos.

HECES EXCRETADAS EN PAVO 1969																													
MES	DÍA	C			B1			B2			B3			B4			B5			B6			B7						
		(161) Día Excrec.			(173) Día Excrec.			(166) Día Excrec.			(158) Día Excrec.			(154) Día Excrec.			(158) Día Excrec.			(154) Día Excrec.			(158) Día Excrec.			(154) Día Excrec.			
MAY.	10	13 may.																											
	20	13-15M.																											
	40	28 may.	(174)	64	08	(173)	04	04	(166)	14	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08
JUN.	10	8 Jun.	(174)	32	15	(166)	22	04	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08
	20	24 Jun.	(173)	30	28	(158)	25	14	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08
	30	20 Jun.	(154)	14	24	(148)	4	74	(154)	04	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08	(154)	04	08	(158)	14	08
	40	27 Jun.			74	(154)		24	(154)		48	(154)		74	(154)		74	(154)		74	(154)		74	(154)		74	(154)		74
JUL.	10	2 Jul.																											
	20	16 Jul.																											
	40	20 Jul.																											
AGO.	10	8 ag.																											
	20	14 ag.																											
	30	23 ag.																											
SEP.	10	8 sep.																											
OCT.	10	8 oct.																											
	20	15 oct.																											
NOV.	10	4 nov.																											
ESTADO DESARROLLADO		Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			Hec. Ex. = Ex. =			
FORMA OBSERVADO		(154)	(74)	(154)	(154)	(154)	(74)	(154)	(154)	(74)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	(154)	

1) = observado en esa fecha.
 2) = desarrollo puntual entre heces.
 3) = liberación observada en el interior del huevo.

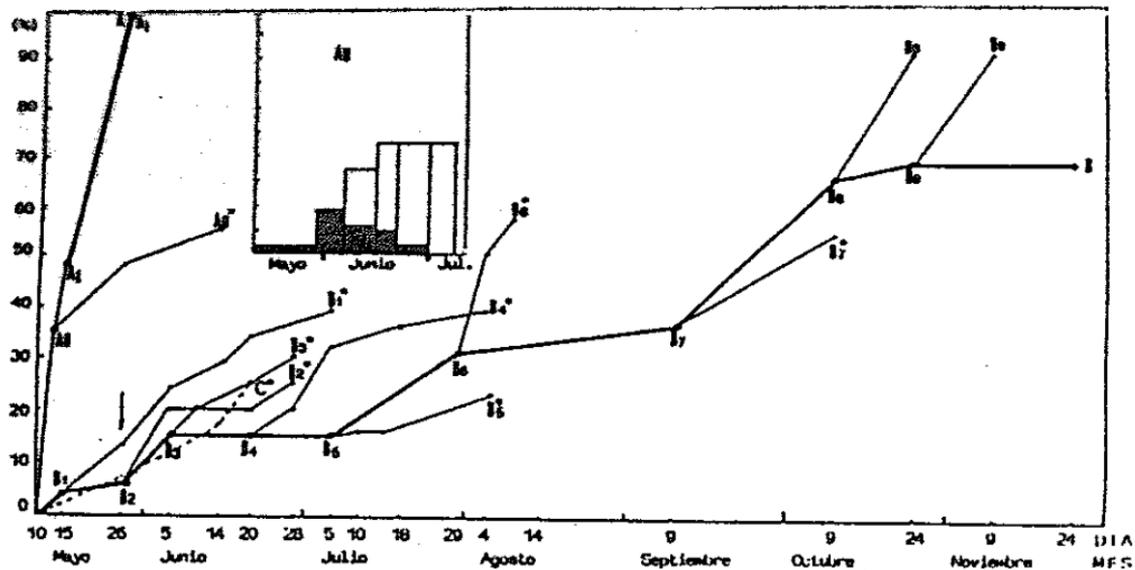


GRAFICO My.I : Mortalidad de los huevos de *F.hepatica* excretados en mayo e incluidos en heces a H.H. ambiental (A) o a saturación de agua (B) liberados de unas u otras a distintos tiempos (A₀, A₁, C, B₁). Desarrollo en A₀ (▨ embrionados, □ eclosionados). | momento a partir del cual se observa desarrollo. * cultivos en los que existirá desarrollo.

Tabla Ja.1: Desarrollo de los huevos de *V. hepatica* excretados en junio y liberados de heces a saturación de agua a diferentes tiempos.

HECES EXCRETADAS EN JUNIO 1969														
MES	SEM	FECHA	C			B1			B2			B3		
JUN.	1*	6 jun.	{0%} Día Extrac.			{7%} Día Extrac.			{10%} Día Extrac.					
	2*	14 jun.	{10%}	4%	0%		3%	0%						
	3*	20 jun.		39%	4%									
	4*	28 jun.	{10%}	42%	35%	{18%}	37%	6%						
JUL.	1*	5 jul.	{15%}		9%	{27%}	23%	25%				{10%} Día Extrac.		
	2*	10 jul.			2%		10%	7%		8%	0%			
	3*	18 jul.						14%		41%	10%			
	4*	25 jul.			10%			5%		21%	51%			
AGOS.	1*	4 ag.			14%			0%			2%			
	2*	14 ag.			0%			9%			2%			
	3*	23 ag.			7%			7%			2%			
ESTADO DESARROLLO			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*		
FINAL OBSERVADO			{15%} {4%} {0%			{27%} {73%}			{30%} {70%}			{30%} {70%}		

{ } : observado en esa fecha.

* : desarrollo puntual entre análisis.

% : miracidios alterados en el interior del huevo.

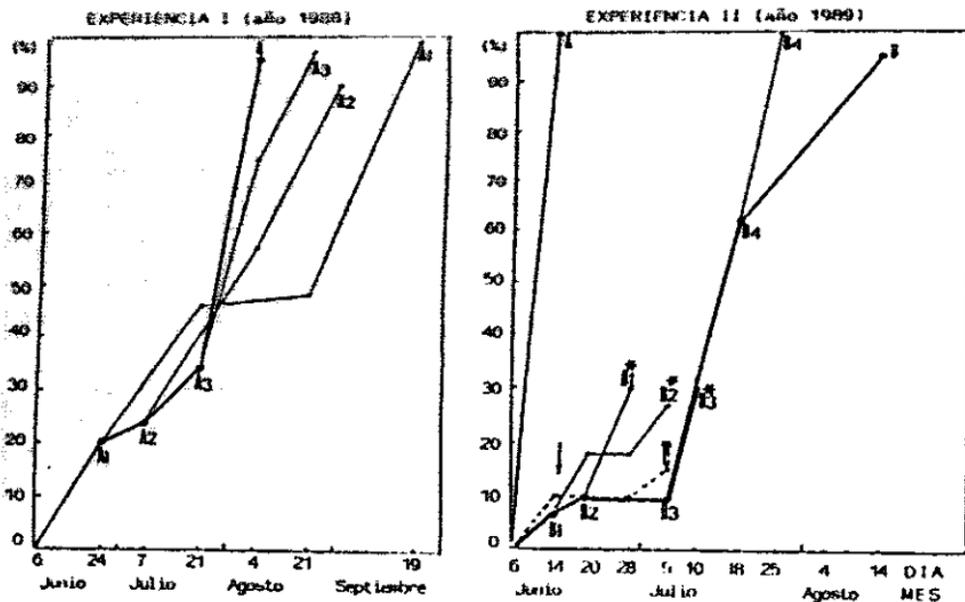


GRAFICO Jn.I : Mortalidad de los huevos de *F. hepatica* secretados en junio e incluidos en heres a H.R. ambiental (A) o a saturación de agua (B) y liberados de unas u otras (A₁ ..., C, B₁ ...).

↓ momento a partir del cual se observa desarrollo.

* cultivos en los que se observará desarrollo.

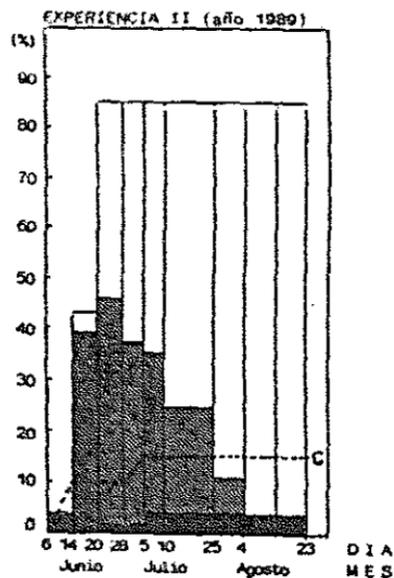
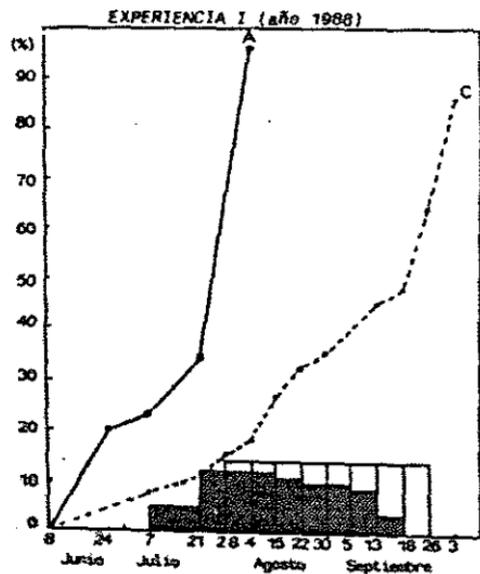


GRAFICO Jn. II : Desarrollo de los huevos de *F. hepatica* excretados en junio y liberados de la masa fecal en el momento de su excreción (■ huevos embrionados □ huevos eclosionados) ■ mortalidad en embriónación, --- C mortalidad en morula), Mortalidad de huevos en heces a M.R. ambiental.(A).

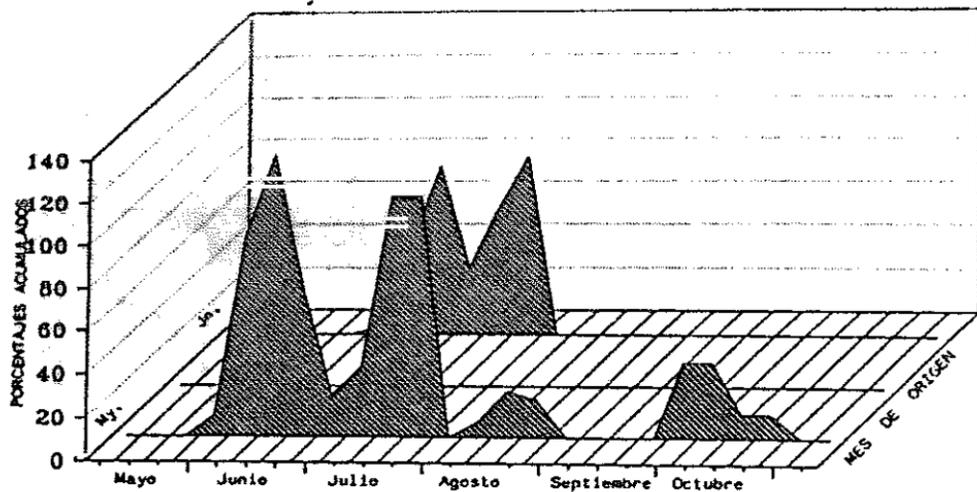


GRAFICO IVA : Periodo de tiempo en el que se observa embrionación de los huevos de *F. hepatica* que, excretados en mayo y junio, son liberados secuencialmente de las heces.

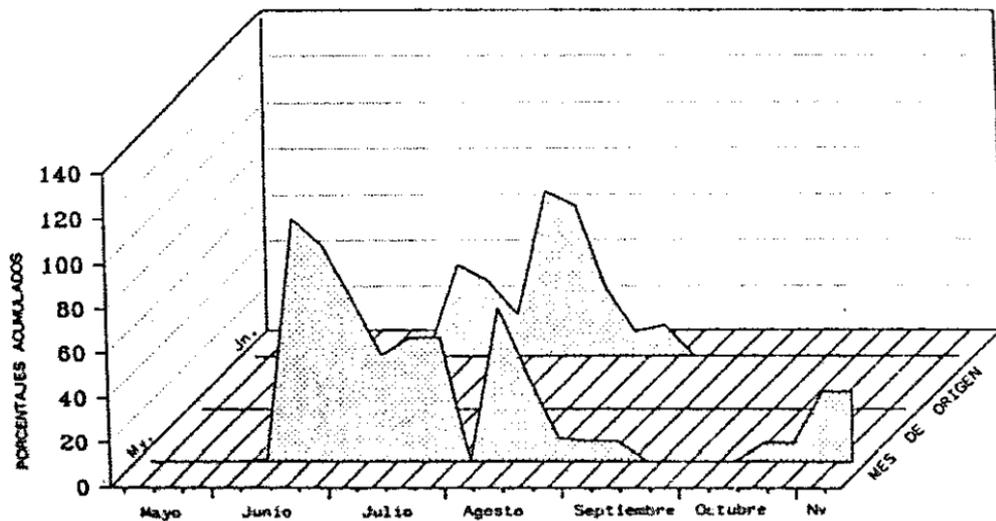


GRAFICO IVb : Periodo de tiempo en que se observa eclosión de los huevos de F.hepatica que, excretados en mayo y junio, son liberados de las heces secuencialmente.

Tabla J1.1: Desarrollo de los huevos de *F.hepatica* excretados en julio y liberados a distintos tiempos de heces a saturación de agua.

HECES EXCRETADAS EN JULIO 1989								
MES	SEM	FECHA	C			B2		
			(0%) Día Extrac.			(53%) Día Extrac.		
JUL.	1*	3 jul.	(0%)					
	2*	10 jul.	(25%)	5%	0%			
	3*	19 jul.	(26%)	40%	9%			
	4*	25 jul.	(28%)	14%	28%	(90%)	0%	0%
AGOS.	1*	4 ag.	(33%)	6%	10%		0%	0%
	2*	14 ag.	(35%)		5%		10%	5%
	3*	23 ag.			13%			5%
ESTADO DESARROLLO			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*		
FINAL OBSERVADO			(35%) (65%)			(90%) (10%)		

(): % observado en esa fecha.

* : % desarrollo puntual entre análisis.

** : % miracidios alterados en el interior del huevo.

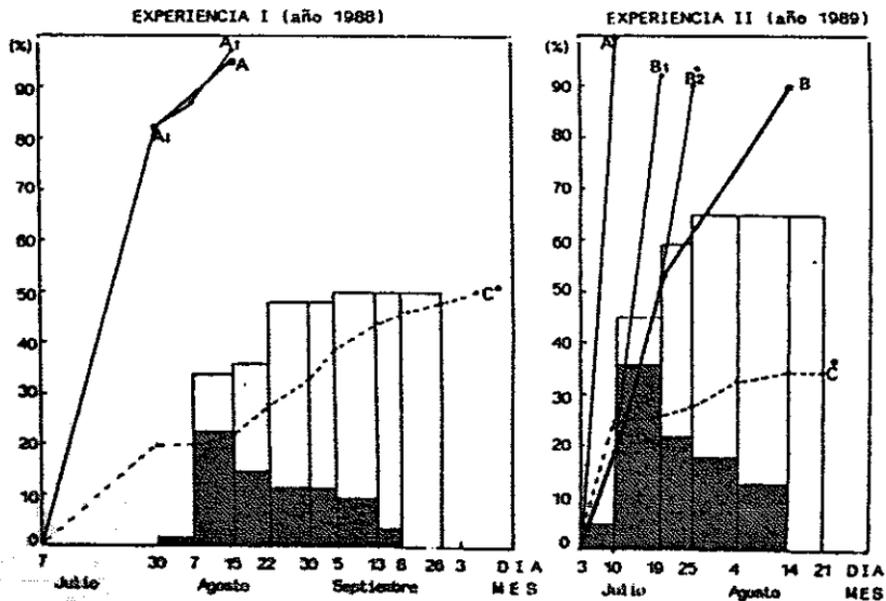


GRAFICO J1,I : Mortalidad de los huevos de *F.hepatica* excretados en julio e incluidos en heces a H.R. ambiental (A) o a saturación de agua (B) o liberados de unas u otras en distintos momentos tras su excreción (A₁, C, B₁ y B₂).
 Desarrollo de los huevos liberados en el momento de su excreción
 ■ huevos embrionados, □ huevos eclosionados.

Tabla A9.1: Desarrollo de los huevos de *F. homolion* secretados en agosto y liberados de heces a saturación de agua a diferentes tiempos.

HECES SECRETADAS EN AGOSTO 1967																		
MES	SEM	FECHA	C			D1			D2			D3			D4			
JUL.	4*	30 Jul.	[(91) Día Extrac.															
AGOS.	1*	4 ag.	(243)	01	01	[(103) Día Extrac.												
	2*	12 ag.		71	01	(281)	61	01	(128) Día Extrac.									
	1*	18 ag.	(241)	81	31		581	141	(251)	51	01	(121) Día Extrac.						
	4*	24 ag.	(271)	231	101		81	121	(251)	601	11	(121) Día Extrac.						
SEP.	1*	1 sep.		161	151			211	(301)	51	591	(121) Día Extrac.						
		9 sep.		191	151			161			01							
	2*	14 sep.			261			31			01							
	4*	29 sep.			11			21			41							
OCT.	1*	9 oct.									741	01						
	2*	16 oct.									01	581				(261) Día Extrac.		
	3*	23 oct.									41	01	161					
ESTADO DESARROLLO			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*			Mort. Emb.* Ecl.*			
FINAL OBSERVADO			(271) (31)* (701)			(281) (41)* (681)			(301) (51)* (651)			(221) (281)			(301) (21)* (681)			

(1): 1 observado en esa fecha.

*: 1 desarrollo puntual entre análisis.

•: 1 miracidios alterados en el interior del huevo.

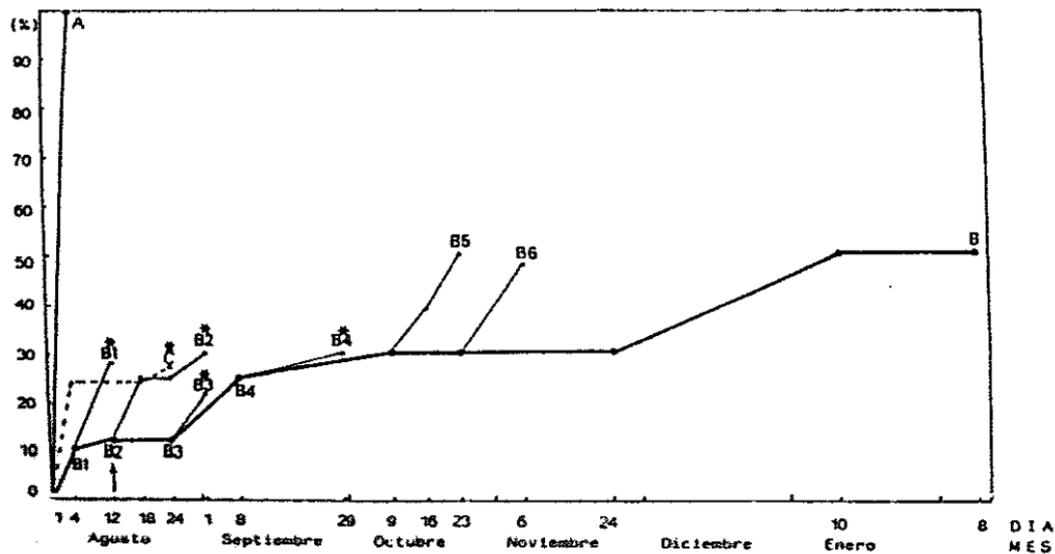


GRAFICO Ag. I : Mortalidad de los huevos de *F. hepatica* excretados en agosto e incluidos en heces a H.R. ambiental (A) o a saturación de agua (B) o liberados de estas últimas a distintos tiempos tras su excreción (C, B₁,).
 † momento a partir del cual se observa desarrollo.
 * cultivos en los que existirá desarrollo.

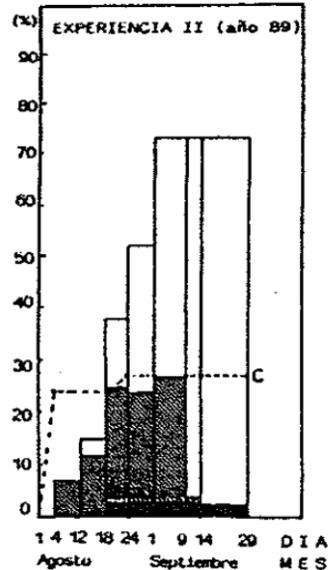
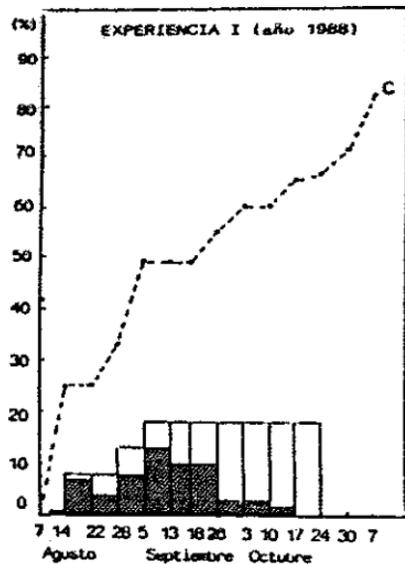


GRAFICO Ag.II: Desarrollo de los huevos de *F.hepatica* excretados en agosto y liberados de la masa fecal en el momento de su excreción (■ embrionados, □ eclosionados, --- C mortalidad en óvula, ■ mortalidad en embrionación).

Tabla Sp.1: Desarrollo de los buevos de *F. hepatica* excretados en suelo libre y mantenidos en becas a humedad relativa ambiente (A1...) o a saturación de agua (C, B1.....) durante diferentes periodos de tiempo.

HECETS EXCRETADAS EN SEPTIEMBRE 1969																							
MEZ	SEÑ	FECHA	C		A1			B1			A2			B2			B3			B4			
SEP.	1 ^o	8 sep.	(101)	Mín. Extrac.	(104)	Día Extrac.	(105)	Día Extrac.	(106)	Día Extrac.	(107)	Día Extrac.	(108)	Día Extrac.	(109)	Día Extrac.	(110)	Día Extrac.	(111)	Día Extrac.	(112)	Día Extrac.	
	2 ^o	12 sep. <td>(125)</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td></td>	(125)	0%	0%																		
	3 ^o	17 sep. <td>(146)</td> <td>10%</td> <td>0%</td> <td></td>	(146)	10%	0%																		
	4 ^o	24 sep. <td></td>																					
	5 ^o	1 oct. <td></td> <td>10%</td> <td>0%</td> <td></td>		10%	0%																		
	6 ^o	10 oct. <td></td>																					
	7 ^o	24 oct. <td>(131)</td> <td>5%</td> <td>0%</td> <td></td>	(131)	5%	0%																		
	8 ^o	8 nov. <td></td> <td>5%</td> <td>3%</td> <td></td>		5%	3%																		
	9 ^o	15 nov. <td></td>																					
	10 ^o	26 feb. <td></td>																					
	11 ^o	10 mar. <td></td>																					
	12 ^o	11 abr. <td></td>																					
	13 ^o	11 abr. <td></td>																					
	14 ^o	5 may. <td></td>																					
	15 ^o	10 may. <td></td>																					
	16 ^o	23 may. <td></td>																					
	17 ^o	29 may. <td></td>																					
	18 ^o	1 Jun. <td></td>																					
	19 ^o	1 Jun. <td></td>																					
ESTADO MENSUAL			Mort. Emb. = Ecl. =																				
Franch. observada			(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)	(125)

1) 4 observado en una fecha.
 2) 1 observado puntual entre análisis.
 3) 3 observados alocados en el interior del buevo.

Tabla Sp.2: Datos sobre el desarrollo de los huevos de E.hapatica a Tª cta. de 26°C, tras permanecer más de 80 días en heces excretadas en septiembre y mantenidas a saturación de agua.

CONTROL	Fecha incub.	FASE DE DESARROLLO				Tiempo incub.
		Móvil.	Mort.	Emb.	Ecl.	
B5	24 nov.	0%	82%	7%	11%	40 días
B6	10 en.	2%	61%	24%	13%	40 días
B7	9 feb.	14%	77%	9%	0%	15 días

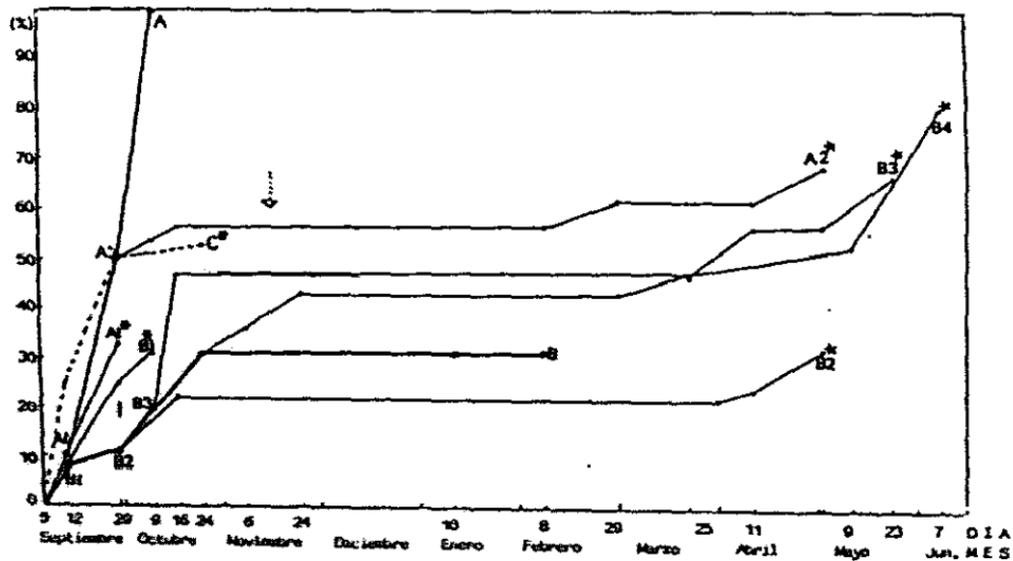


GRAFICO No. I : Mortalidad de los huevos de *F. hepatica* excretados en septiembre e incluidos en heces a M.R. ambiental (A) o a saturación de agua (B) o liberados de unas u otras a distintos tiempos (C, A₁, A₂, B₁ .. B₄). ↑ momento a partir del cual se observa desarrollo, ↓ comienzo del período de temperaturas inhibitorias, *cultivos en los que se observará desarrollo.

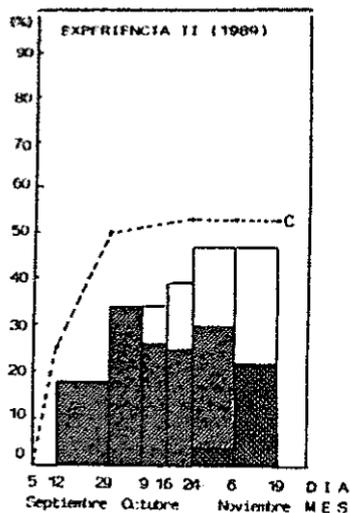
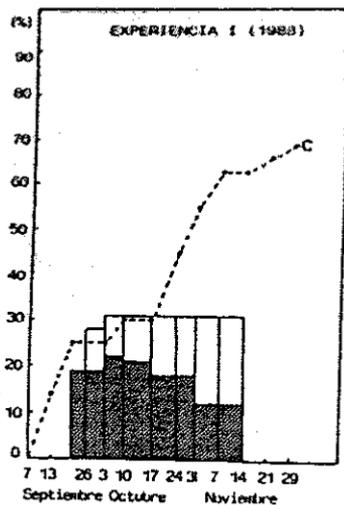


GRAFICO Sp.II : Desarrollo de los huevos de *F.hepatica* excretados en septiembre y liberados de la masa fecal en el momento de su excreción.
 ■ huevos embrionados, □ huevos eclosionados, ▒ mortalidad de huevos embrionados, --- mortalidad de huevos en cáscara.

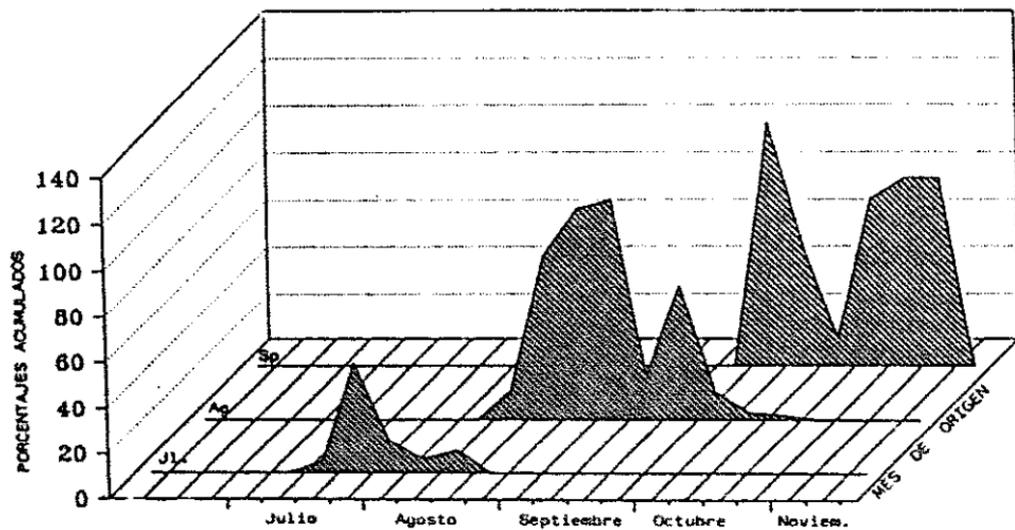


GRAFICO Va : Periodo de tiempo en que se observa embrionación de los huevos de *F.hepatica* que, excretados en verano, son liberados secuencialmente de las heces.

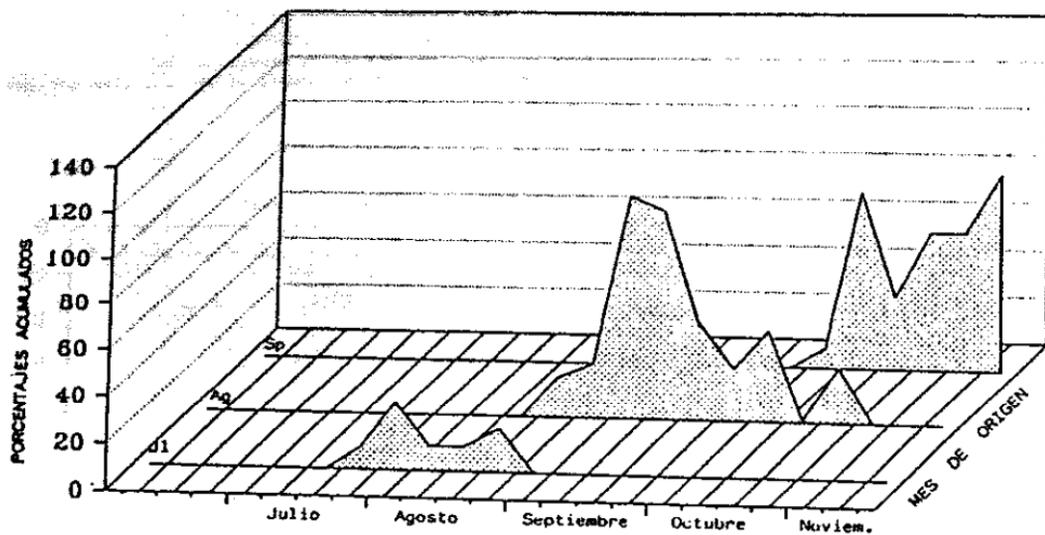


GRAFICO Vb : Periodo de tiempo en que se observa eclosión de los huevos de *F. hepatica* que, excretados en los meses de verano, son liberados secuencialmente de las heces.

1.2.-ESTUDIO DEL RITMO DE LIBERACION DE LOS HUEVOS DE LAS HECES.

Por conocer el máximo tiempo de permanencia de los huevos en la materia fecal, cuando ésta se encuentra suspendida en agua, así como su ritmo de liberación -en función de la pérdida de consistencia de las heces-, se realizó durante el segundo año una prueba consistente en simular la deposición de heces en zonas permanentemente encharcadas, según el método descrito en capítulo Material y Métodos.

Como queda reflejado en el Gráf.VI, la liberación de los huevos al agua se produjo ya desde el primer día, y a velocidad constante durante las dos primeras semanas (4-5% por semana), aumentando gradualmente durante las siguientes, hasta la 5^a-6^a semana en que alcanzó su máximo valor (19%), habiendo llegado para entonces la liberación al 70% de los huevos. Con un gradual descenso en el ritmo de liberación a partir de entonces, ésta llegaba ya al 90% a la 8^a semana, completándose la liberación en las dos semanas siguientes. En nuestros resultados, por tanto, fue de 10 semanas el máximo periodo de permanencia de los huevos en heces de ovino depositadas en áreas encharcadas y, consecuentemente, inmersas en agua.

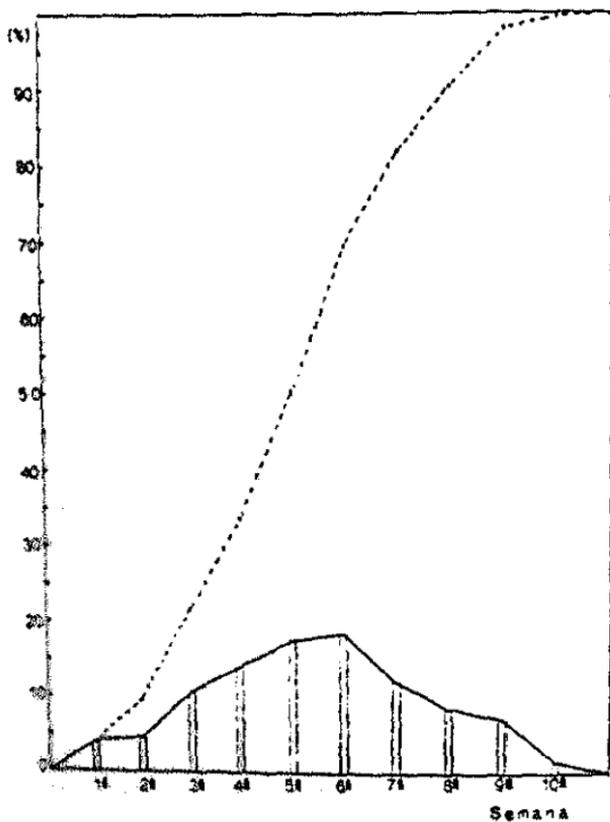


GRÁFICO VI : Ritmo de liberación de los huevos de *F. hepatica* de heces de ovino inmersas en agua (--- % acumulados, — % semanal).

3.3.- ESTUDIO SOBRE LA RELACION Fasciola hepatica - Lymnaea truncatula.

Según se describa en el capítulo Material y Métodos y para facilitar la exposición, dividiremos este subcapítulo en dos apartados, según hagamos referencia a los modelos de infestación o de emisión.

3.3.1.- Factores relacionados con la infestación (periodo de desarrollo larvario intramolusco, tasas de supervivencia, infestación y emisión).

- Grupos de infestación de primavera:

En las infestaciones llevadas a cabo en el segundo año (1989) durante el periodo primaveral, comprendido entre la 3ª semana de abril y 1ª de junio, el comienzo de emisión de cercarias se situó entre la 3ª semana de junio y 3ª de julio (Tabla Pi). El mínimo periodo de desarrollo larvario intramolusco se extendió por tanto entre 59 días -en las infestaciones más tempranas (21 abril, Gi.Oc.)- y 43 días -en las efectuadas durante la primera semana de junio (6 junio, Gi.My.)-, según el Gráfico II.

Como se muestra en la Tabla Pi, durante el segundo año los periodos de comienzo de emisión de cercarias se extendieron entre 59 y 82 días post-contacto (p.c.) en la infestación de abril, entre 44 y 65 días p.c. en las limneas infestadas en mayo (10 mayo y 19 mayo) y con sólo un día de intervalo en las infestadas en junio, que comenzaron la emisión a los 43-44 días p.c.

Los resultados obtenidos durante el primer año (1988), con las infestaciones de primavera (22 abril y 12 mayo), sobre el periodo mínimo de desarrollo larvario intramolusco: 76 días en la

infestación de abril y 56 en la de mayo (Tabla Pi, primer año), confirman la mayor elongación del desarrollo larvario en las infestaciones más tempranas. Excepcionalmente en el primer año estas infestaciones de primavera se realizaron de forma controlada, bajo observación microscópica y con una dosis conocida de miracidios: 3-5 miracidios/limnea, lo que permitió, por tanto, conocer la fecha exacta de infestación.

Las tasas de supervivencia, infestación y emisión, halladas durante el segundo año con los grupos de infestación de primavera (ver Gráf.III y 2º año en Tabla Pi), resultaron ser muy dispares entre unos grupos y otros y, apartadamente, independientes del momento en que la infestación tuvo lugar dentro de este periodo primaveral. Así, los porcentajes de infestación resultantes (nº líneas infestadas/nº líneas iniciales integrantes de cada grupo) en las infestaciones de mayo oscilaron entre un 13% (Gi.En.) y un 47% (Gi.Mr. y Gi.Ab.); el grupo correspondiente a la infestación de junio (Gi.My.) presentó la tasa máxima (100%), alcanzando un valor intermedio la infestación más temprana, realizada en el mes de abril (69% en Gi.Oc.).

Las tasas de supervivencia (nº líneas vivas al comienzo de emisión/nº líneas iniciales integrantes de cada grupo) fueron, si cabe, más dispares, oscilando entre un 0% y un 74% en los grupos infestados en mayo, correspondiendo el 0% de supervivencia al grupo Gi.Nv (expresado en la Tabla Pi, cuya representación se ha omitido en el Gráf.III). El valor más alto de supervivencia se observó en la infestación más temprana (88% en Gi.Oc), situándose en la de junio (Gi.My) en un 60%. Puede señalarse que en todos estos grupos la mayoría de las líneas llegaron con vida hasta las pocas semanas anteriores al comienzo de emisión, produciéndose sin embargo un cese de actividad en, aproximadamente, un 49% de las mismas durante la 2ª quincena de junio, siendo aquellas líneas que permanecieron activas durante

todo ese tiempo (un 44% aprox.) las únicas supervivientes al comienzo de la emisión. En las poblaciones sin infestar usadas como control, por su parte, no se observó disminución en la emisión de puestas durante dicha quincena.

Las tasas de emisión (nº líneas que llegan a emitir/nº líneas iniciales integrantes de cada grupo) fueron relativamente próximas en las infestaciones de abril y junio (62 y 60% respectivamente), quedando muy por debajo los valores correspondientes a las infestaciones de mayo (6% en Gi.En., 11% en Gi.Fb., 20% en Gi.Mr. y Gi.Ab.). Como consecuencia, el éxito de infestación (nº líneas que llegan a emitir cercarias/nº líneas que llegan a infestarse) mostró diferencias menos marcadas entre unos grupos y otros, alcanzándose el valor más alto en la infestación de abril (91%), quedando entre un 43% y un 50% en las de mayo y subiendo nuevamente al 60% en la de junio.

Considerada globalmente la población de líneas que en nuestras experiencias del 2º año fueron infestadas durante la primavera, entre finales de abril y comienzos de junio (85 líneas), se observó una supervivencia al comienzo de emisión de un 44% (41 líneas), siendo muy próximo (45%) el porcentaje de infestación (34 de las 76 líneas que pudieron ser estudiadas, excepción hecha del grupo Gi.Nv. cuyo ocultamiento bajo el fango imposibilitó su control). Del total de líneas infestadas, sin embargo, sólo 21 llegaron a emitir cercarias, siendo pues la contribución de la población de primavera a la contaminación del medio con cercarias de sólo un 25% (ver Tabla Pi, 2º año).

Los dos grupos formados para las infestaciones de primavera en el primer año fueron infestados con huevos procedentes de los mismos meses (octubre-febrero, sin incluirse los de marzo por no mostrar desarrollo a medio ambiente, ni los de meses posteriores, que aún no lo habían alcanzado para esta época). La supervivencia al comienzo de emisión fue del 80% y 60%



respectivamente en la infestación de abril y mayo (Tabla Pi., primer año). Como ya hemos indicado al referirnos al periodo de desarrollo larvario, en nuestras experiencias del primer año las infestaciones se realizaron de forma controlada, bajo observación microscópica y con dosis conocida de miracidios (3-5/limnea), por lo que la infestación, o al menos la penetración de miracidios, quedó garantizada en el total de limneas, siendo pues del 100% su tasa de infestación. De esta forma, los resultados obtenidos sobre porcentajes de supervivencia, emisión y éxito de infestación coincidieron en cada grupo, tal como se muestra en la Tabla Pi. Considerada globalmente la población infestada durante la primavera de este primer año, dichos porcentajes fueron del 70%.

- Grupos de infestación de verano:

En las infestaciones realizadas durante el segundo año dentro de la época estival (22 junio-1 septiembre) destaca la considerable prolongación del periodo de desarrollo larvario en el último grupo (infestación de septiembre: Gi.Ag.2 en Tabla Vi), seguida de la de agosto (Gi.Ag.1 en la misma Tabla), frente a los tiempos requeridos para el desarrollo en las infestaciones de junio y julio (Gi.Jn. y Gi.Jl.), como queda reflejado en el Gráf.Ii. De esta forma, el comienzo de emisión de cercarias tuvo lugar en agosto en los dos primeros grupos (infestaciones de junio y julio), a raíz de lo cual considerados como de infestación "temprana" de verano, retrasándose hasta los meses de octubre y noviembre en los dos últimos (infestados en agosto y en septiembre), considerados por tanto como grupos de infestación de verano "tardía".

Como se muestra en el Gráf.Iii, las mayores tasas de supervivencia, infestación y emisión correspondieron a la infestación de agosto, siendo ésta la más productiva (89% de emisión en Gi.Ag.1), seguida de las infestaciones "tempranas"

(50% y 57% de emisión en G1.Jn. y G1.J1., respectivamente). Resalta en dicho gráfico la relativamente escasa infestación observada en la población de septiembre (46% en G1.Ag.2) frente a la obtenida en el resto de los grupos (donde no bajó del 70%). Presentaron además las líneas infestadas en septiembre una menor supervivencia (42%) que el resto y con la particularidad de que en aquel grupo la mortalidad se produjo fundamentalmente en líneas que no llegaron a infestarse, a diferencia de lo ocurrido en los otros tres grupos, como queda reflejado en el mismo Gráfico. Merece también destacarse dentro de la población de verano el menor éxito de infestación obtenido en el grupo de junio (56% en G1.Jn., Tabla Vi).

Al igual que ocurriera con la población infestada en primavera, de las líneas que, en los grupos de infestación "temprana" de verano, causaron baja al comienzo de emisión (44%) una gran proporción había acusado estivación (36%), en este caso desde el 10 de julio, apreciándose sólo la supervivencia de las que habían permanecido activas. En los correspondientes controles sin infestar, por su parte, pese a no producirse verdadera estivación, pudo observarse una cierta disminución en la actividad de algunos ejemplares acusándose también un marcado descenso en la emisión de puestas, pero no hasta la última semana de agosto (en la población infestada el letargo se produjo desde la 2ª semana).

En los grupos de infestación "tardía" (agosto y septiembre) no llegó a observarse el ocultamiento bajo el fango, sino el descenso en la actividad por parte de algunas líneas del último grupo (infestación de septiembre) y no de modo constante, a pesar de la considerable mortalidad alcanzada al comienzo de emisión (64% aprox.). Por otra parte, en los respectivos controles sin infestar se observó un brusco descenso en la emisión de puestas durante la última semana de octubre y primera de noviembre, sin producirse mortalidad digna de mención.

De esta forma y con las particularidades ya indicadas para cada uno de los grupos, en el estudio de la población infestada en verano durante el 2º año, la mortalidad observada fue del 45% aproximadamente y la infestación de un 71% que, con un éxito aproximado del 76% (31 líneas de las 41 infestadas), dio lugar a la emisión en un 53% de las líneas (31 de las 58 líneas integrantes de la población), como se indica en la Tabla Vi.

En el primer año, las infestaciones correspondientes a la época estival se realizaron todas en agosto. Como se muestra en la Tabla Vi, el comienzo de emisión no tuvo lugar hasta octubre, como ocurriría con la infestación realizada por las mismas fechas en el 2º año (ver Gi.Ag.1 en Tabla Vi ó Gráf.II), presentando así periodos mínimos de desarrollo larvario muy parecidos en ambos años (Tabla Vi). Como en el grupo homólogo del segundo año (infestado en agosto), las tasas de supervivencia y emisión coincidieron en la población infestada en agosto del primer año (tanto en Gi.Jn como en Gi.Jl), cuyo valor en este caso fue del 73% de la población global (16 de las 22 líneas totales), cifra algo menor a la observada al año siguiente, como se muestra en la Tabla Vi. Aunque no conocemos el momento en que tuvo lugar la estivación en la población infestada del primer año, el 27% de mortalidad observado para el comienzo de emisión correspondió a las líneas que habían estado aletargadas, cuya avanzada degeneración imposibilitó su posterior estudio, por lo que desconocemos la tasa de infestación producida.

- Grupos de infestación de otoño:

Durante el otoño del segundo año se configuraron dos grupos de infestación con los huevos excretados en septiembre, según se muestra en la Tabla Oi. De ellos, sólo las líneas infestadas en octubre (Gi.Sp.1) llegarían a emitir cercarias dentro del mismo año, a partir de la segunda mitad de diciembre, con un mínimo

periodo de desarrollo larvario de 61 días (Gráf.II), extendiéndose el comienzo de emisión hasta los 71 días post-contacto (Tabla OI).

Con elevados porcentajes de supervivencia e infestación en este grupo de octubre (90%) y un éxito en la infestación del 94%, la tasa de emisión fue del 85%, próxima a la de la infestación de agosto (Gráf.III). Cabe indicar que el éxito de infestación no fue del 100% a causa del retraso en el desarrollo larvario en una línea que mantuvo una menor actividad que el resto de la población y cuya disección al comienzo del siguiente año mostró la presencia del parásito aún en fase de redia y sin cercarias. En el grupo control sin infestar se observó un marcado descenso en la emisión de puestas a partir de la última semana de noviembre. Dichas puestas no comenzarían a eclosionar hasta la 3ª semana de diciembre, coincidiendo con el momento en que la población infestada comenzó a emitir cercarias.

Ninguna de las líneas infestadas en noviembre (G1.Sp2) llegaría a emitir cercarias en ese año, retrasándose el comienzo de emisión hasta bien entrada la primavera del año siguiente (mediados de mayo: Gráf.II y Tabla OI). La infestación fue total (100%) en dicho grupo, mostrando además una supervivencia al comienzo de emisión relativamente alta (75%) teniendo en cuenta el prolongado periodo transcurrido (aproximadamente unos 6 meses de desarrollo larvario). Dicha ralentización del desarrollo de E. hepatica fue corroborada mediante la disección de dos líneas del grupo a comienzos de enero, cuando, transcurridos dos meses desde el día de contaminación, sólo se encontraron esporocistos y radias inmaduras (sin cercarias en su interior). En dicho grupo además, curiosamente, se mantuvo la emisión de puestas, en similar proporción a la de la población control sin infestar, hasta la 3ª semana de marzo, cesando bruscamente a partir de entonces, sin que se volviera a reanudar. Dicho cese de oviposición en las líneas infestadas coincidió con una ligera

disminución de la emisión de puestas en la población control que, sin embargo, reanudaría su normal actividad reproductora a partir de la 2ª semana de abril.

Como se muestra en la Tabla Oi, en ninguno de los grupos infestados durante el otoño del primer año, ni siquiera en la infestación provocada en septiembre, pudo observarse emisión de cercarias durante el resto del año ni llegarían a producir contaminación alguna en adelante, puesto que a partir de la 3ª sem. de diciembre se produjo el total letargo de las mismas, quedando una gran proporción ocultas bajo el fango, sin reanudar desde entonces su actividad, comprobándose su muerte a la primavera del año siguiente. Durante todo el periodo invernal y pese a las frecuentes heladas nocturnas, que en ocasiones llegaron a producir una gruesa capa de hielo en la superficie líquida de los hábitats, la mayor parte de la población control sin infestar se mantuvo activa y con emisión de puestas, aunque éstas no llegaron a eclosionar durante todo el periodo de heladas.

3.3.2.- Dinámica de las poblaciones en emisión (supervivencia y actividad de las limneas durante el periodo de emisión de cercarias).

Se subdividirá este apartado por épocas, haciendo referencia al comienzo de emisión de cercarias en las distintas poblaciones, reagrupadas bajo este criterio en los denominados "grupos de emisión" según el modelo descrito en el capítulo Material y Métodos (individualización de las limneas supervivientes en cada G1. al comienzo de emisión y transferencia de las contaminantes a un nuevo hábitat, común para todas las que comenzaron a emitir en una misma época).

- Grupo de emisión VERANO I (comienzo de emisión: 20 junio-20

julio en G1.primavera -> Ge.VI: 21 limneas).

Como se indicó en el apartado anterior, en el segundo año de estudio la emisión de las primeras cercarias tuvo lugar desde la tercera semana de junio hasta la tercera de julio en la población infestada en primavera, como se refleja en el Gráfico Ie. Al cabo de este periodo quedó constituido el grupo de emisión Ge.VI (así denominado por comenzar su emisión durante la primera parte del verano), formado por un total de 21 limneas (total de limneas que llegaron a emitir de las 43 supervivientes al comienzo de emisión).

Dicha población, responsable de la contaminación producida durante la primera parte del verano, mantuvo, como se muestra en el Gráf.IIe, su total integridad durante las dos primeras semanas de emisión (Ult. junio y 1ª jul.) y, salvo un ligero descenso durante la semana siguiente (6% de mortalidad), la tasa de actividad (indica en nuestro estudio del número de limneas potencialmente capaces de provocar contaminación, calculado respecto del total de limneas que han llegado a emitir hasta el momento) se mantuvo en un 95% hasta la 3ª semana de julio (ver Gráf.IIe). Durante la última semana de este mes se produjo el cese de actividad en el resto de las integrantes de la población en emisión, observándose su parcial inmersión bajo el fango y, por supuesto, el total cese de emisión de cercarias. Periodo de emisión que finalizó a partir de entonces por muerte de las limneas integrantes de dicha población, como pudo comprobarse mediante disección durante la primera semana de agosto. La población sin infestar mantuvo por su parte una normal actividad durante todo julio y la mayor parte de agosto.

Tal situación fue casi una réplica de lo sucedido durante el primer año, donde la contaminación de verano (a partir del 7 jul.), a cargo de las limneas infestadas durante la primavera, sólo se produjo a lo largo de unas cuatro semanas (hasta el 7 de

agosto), interrumpiéndose a causa de la desecación accidental que se produjo durante una semana en el hábitat, al cabo de la cual ninguna de las limneas (parcialmente ocultas bajo el fango) reanudó su actividad a pesar de la irrigación del medio, comprobándose su muerte a finales de agosto mediante disección.

Para conocer el efecto de la desecación sobre el comportamiento de los moluscos, se realizó durante el segundo año una prueba accesoria durante la época estival (julio-agosto), en la que se sometió a tres grupos homólogos en número y tamaño de limneas, en proporción representativa de la población existente en el medio durante esa época -70% $\leq 0.1\text{cm}$ (14 limneas); 10% de 0.3-0-4cm (2 limneas) y 20% $\geq 0.5\text{cm}$ (4 limneas)- a idénticas condiciones iniciales y diferente evolución posterior, como a continuación exponremos:

En el primer grupo (GI) se permitió la evaporación paulatina de la capa líquida del hábitat, pero se mantuvo permanentemente con humedad del 100% en el fango y al amparo de las lluvias para evitar su encharcamiento.

En los otros dos grupos se provocó la desecación total del fango, sometiénolos a la evaporación ambiental, de forma gradual en uno (GII), que se mantuvo bajo techado para reducir la velocidad de evaporación, y de modo más brusco en el último grupo (GIII), no protegido.

Dicha evaporación y la posterior desecación del hábitat de los dos últimos grupos se produjo durante la primera semana (13-18 jul.), al cabo de la cual se observó la disposición de las limneas con la apertura de la concha hacia el fango en el hábitat húmedo (GI) y en el mantenido a cubierto (GII), donde la tierra aún no estaba agrietada. En el tercer grupo (GIII) se apreciaban ya grietas en el soporte arcilloso, presentando las limneas un aspecto de deshidratación, sin aproximación de la apertura de la

concha a la tierra y aparentemente muertas.

A la segunda semana la situación era parecida, sin enterrarse las limneas en ninguno de los grupos y manteniendo su disposición hacia el fango en los dos primeros, observándose movimiento en los moluscos del hábitat húmedo (GI) a diferencia del segundo (GII), donde la inactividad era total.

Con similar situación al cabo de un mes, se comprobó la supervivencia del 100% en las limneas del primer grupo (GI), del 50% en el segundo (10% tamaño grande y 40% pequeñas) y del 0% en el tercero (GIII), sin haberse producido en ningún caso el ocultamiento de las limneas bajo el fango.

- Grupos de emisión VERANO II (comienzo de emisión: 10 agosto-26 septiembre en G1."temprana" verano: G1.Jn y G1.Jl -> Ga V2: 13 limneas).

Tras el cese total de emisión producido en la población contaminante de verano I (Ge.V1) a partir de la 4ª sem. jul., la única posibilidad de contaminación del medio con nuevas metacercarias dependería del comienzo de emisión en las poblaciones infestadas en junio y julio (únicas infestadas hasta ese momento). Dicho comienzo tuvo lugar entre el 10 y 27 de agosto en el grupo de junio (G1.Jn) y entre el 29 agost. y 26 sept. en la población de julio (G1.Jl), como se muestra en el Gráf.IIIe.

Como se indicara en el apartado correspondiente a los grupos de infestación, en el primer caso (G1.Jn) llegaron a emitir el total de las supervivientes (9 limneas), siendo 4 las limneas contaminantes del segundo grupo (G1.Jl) de las 5 que permanecían vivas al comienzo de emisión. Completado el comienzo de emisión en este último (a finales de septiembre), ambos grupos se juntaron en un único hábitat, para constituir el grupo de emisión

denominado Verano II (Ge.V2). Para entonces, las limneas que, infestadas en junio (Gi.Jn), llevaban emitiendo desde agosto, ya habían sufrido un 22% de mortalidad, por lo que a finales de septiembre la población integrante de este grupo de emisión (Ge.V2) era un 85% del total que había llegado a emitir, como se refleja en el Gráfico IIIe. Tras una nueva mortalidad importante (23%), producida durante los últimos días de septiembre, la posibilidad de contaminación quedó reducida a un 62% hasta el mes de noviembre, en el que se mantuvo la población sin cambios, salvo pequeños porcentajes de inactividad. Fue a finales de noviembre cuando se produjo una mortalidad del 39%, momento a partir del cual las limneas supervivientes se agruparían con otras dos poblaciones ya entonces en emisión (Ge.otoño), de las que a continuación hablaremos, realizándose su estudio posterior de forma global.

- Grupos de emisión de OTOÑO (comienzo de emisión: 9-21 octubre en Gi.Ag.1 -> Ge.Oc: 8 limneas; 16-28 noviembre en Gi.Ag.2 -> Ge.Nv: 10 limneas).

Como se muestra en el Gráf.IIIe, una nueva población emisora vendría a añadirse, a partir de octubre, a la población que se encontraba en emisión desde agosto (Ge.V2, con un 62% de actividad para entonces). Esta nueva oleada de emisión de cercarias tuvo comienzo entre el 9 y 21 octubre en el total de limneas supervivientes de la población infestada en agosto (8 limneas de Gi.Ag.1). La actividad de este nuevo grupo de emisión (Ge.Oc) disminuyó en un 12% durante la 3ª semana de octubre (antes de concluir el comienzo de emisión) y, tras una importante mortalidad (63%) producida durante la 2ª semana de noviembre, la capacidad contaminante quedó reducida a un 37%, porcentaje que se mantuvo desde entonces sin merma en número ni actividad de sus componentes hasta finales de dicho mes, momento en que esta población se juntó con la que comenzó a emitir en noviembre, de cuyo ritmo de emisión hablaremos a continuación.

La siguiente población en emisión a añadir a las precedentes (cuya actividad para entonces era de un 54% en Ge.V2 y 25% en Ge.Oc) apareció en la segunda mitad de noviembre (16-28 nov.), compuesta por el total de líneas supervivientes de la población infestada en septiembre (10 líneas de Gi.Ag2). Completado el comienzo de emisión, este último grupo (Ge.Nv) se juntó en un nuevo hábitat con las dos poblaciones en emisión existentes (Ge.V2 y Ge.Oc) según el Gráf.IIIe, realizándose en adelante su estudio de forma global, constituida esta nueva población (Ge.V-0) por el 47% del total de líneas que de uno u otro grupo habían llegado a emitir (14 de 30 líneas y no de 31 totales, por desaparición accidental de una de ellas).

- Grupo de emisión DICIEMBRE (comienzo de emisión: 17-27 diciembre en Gi.Sp.1 -> Ge.Dc: 17 líneas).

La última población contaminante del año se presentó durante la segunda mitad de diciembre (17-27 dic., ver Ge.Dc en Gráf.IIIe), por parte de 17 líneas de las 18 supervivientes del grupo infestado en octubre (Gi.Sp.1) cuando la actividad de la población que se encontraba en emisión (Ge.V-0), globalmente considerada, aún era del 47%. Esta nueva emisión, sin embargo, se interrumpiría a comienzos de enero, un mes antes que en la población precedente, pese a la total vitalidad mantenida en esta última (Ge.Dc) durante todo ese mes (ver zona delimitada por línea discontinua en Gráf.IIIe).

El periodo de no emisión, que se produjo en el primer grupo (Ge.V-0) desde comienzos de febrero, se mantuvo en ambas poblaciones hasta la primera semana de marzo (zona discontinua en Gráf.IIIe). Durante dicho periodo, se observó también en la última población (Ge.Dc) un gradual descenso en la actividad de las líneas, pasando de un porcentaje de letargo del 25-15% al 46% hacia la 1ª sem. marzo), frente al nulo o escaso letargo (7%)

que por las mismas fechas presentaba la población más antigua (Ge.V-0).

Reanudada la emisión de cercarias (en ambos grupos desde la segunda semana de marzo, ver trazo continuo en Gráf.IIIe), la supervivencia era aún del 100% en la población más reciente (Ge.Dc), con posibilidad de emisión en un 77%, quedando en la población más antigua un 40% de limneas vivas (14/30) y con posibilidad de emisión. Dicha emisión sin embargo fue particularmente escasa durante este mes en ambas poblaciones. A lo largo de los meses de marzo y abril el primer grupo (Ge.V-0) sufriría una gradual reducción en número por mortalidad, quedando a finales de abril con sólo un 20% de las limneas iniciales, para desaparecer dicha población una semana más tarde (7 mayo) por muerte de sus componentes.

Desde el comienzo de la primavera (3ª sem. marzo) se produjo un aumento del letargo en la última población infestada (Ge.Dc), que llegaría al 69% hacia la segunda semana de abril, oscilando entre un 15 y un 38% durante las dos semanas siguientes. Para la primera semana de mayo, cuando era ésta la única población superviviente del año anterior, la posibilidad de emisión se presentaba en un 69% de los efectivos, por mostrarse el resto en inactividad. Limneas aletargadas que morirían una semana después.

- Grupo de emisión "HIBERNANTE" (comienzo de emisión: 15-16 mayo, en G1.Sp2 -> Ge.Hb: 6 limneas).

Hacia mediados de mayo, cuando la población de diciembre había quedado reducida al 69% por mortalidad, vino a sumarse una nueva emisión, procedente de la población infestada en noviembre del año anterior (G1.Sp2), cuyo comienzo tuvo lugar entre los días 15 y 16 de mayo en el total de limneas supervivientes hasta

esa fecha (6 limneas), según el Gráf.IIIa.

La contribución con metacercarias de este nuevo grupo (Ge.Hb), que se mantuvo en el 100% de los ejemplares durante la 2ª quincena de mayo, no se prolongó más de un mes. Así, tras una progresiva mortalidad, a la 3ª semana de junio, cuando la población superviviente era del 67%, se produjo un total cese de actividad, observándose el 100% de mortalidad una semana más tarde. Para esa época (2ª quincena de junio) las posibilidades de emisión del grupo anterior (Ge.Dc) eran muy escasas, por haberse producido desde mediados de mayo una progresiva mortalidad que dejó reducida la población al 23%, de la que un 25% estaba inactiva (Gráf.IIIe). Emisión que, sin embargo, en este grupo (Ge.Dc) pudo mantenerse durante dos semanas más que en el de infestación hibernante, aunque en un escaso porcentaje de población (8% a primeros de julio, del total de limneas iniciales en el grupo), cesando totalmente a la 2ª semana de julio por estivación de sus componetes y muerte a la siguiente semana.

En las poblaciones sin infestar, usadas en este estudio como control de actividad, los mayores acúmulos de emisión de puestas se produjeron en los meses de octubre y mayo, ocupando un lugar intermedio los de noviembre, febrero y marzo, resultando particularmente desfavorables los meses de enero y julio.

Como ya se indicara en el apartado anterior al hacer referencia a las infestaciones de otoño del primer año, ninguno de los grupos llegaron a producir contaminación del medio con cercarias, por mortalidad de toda la población antes de que se iniciara la emisión.

Tabla Pi: Datos sobre las poblaciones de *L. truncatula* infestadas en los meses de primavera de 1988 (primer año) y de 1989 (segundo año).

G. inf (nº lim.)	Infestación.	1ª emisión	T. desar. larvario (días)	Superv. nº lim. y (%)	Infest nº (a) y (%)	Emis. nº (b) y (%)	Exito inf. b/a (%)
Gi. Oc (16)	21. abr. 1989	20. jun-13. jul.	59-82 d.	14 limn. 87.50%	11 lim. 68.75%	10 l. 62.50%	(10/11) 90.91%
Gi. NV (9)	10. may. 1989	no emisión		0 limn. 0%	(no conocido)	0 lim. 0%	(0) 0%
Gi. En (16)	10. may. 1989	9. jul.	59 d.	3 limn. 18.75%	2 limn. 12.50%	1 lim. 6.25%	(1/2) 50%
Gi. Fb (9)	10. may. 1989	29. jun.	49 d.	1 limn. 11.11%	2 limn. 22.22%	1 lim. 11.11%	(1/2) 50%
Gi. Mr (15)	10. may. 1989	25. jun-15. jul.	45-65 d.	9 limn. 60%	7 limn. 46.66%	3 lim. 20%	(3/7) 42.86%
Gi. Ab (15)	19. may. 1989	3. jul-13. jul.	44-55 d.	11 limn. 73.33%	7 limn. 46.66%	3 lim. 20%	(3/7) 42.86%
Gi. My (5)	6. jun. 1989	20. jul-21. jul.	43-44 d.	3 limn. 60%	5 limn. 100%	3 lim. 60%	(3/5) 60%
Población total (2º año): 85 limneas				41/85 44.38%	34/76* 44.74%	21/85 24.71%	(21/34) 61.76%
Gi. OI (10)	22. abr. 1988	7. jul.	76 d.	8 limn. 80%	10 lim. (100%)*	8 lim. 80%	(8/10) 80%
Gi. OI (10)	12. may. 1988	7. jul.	56 d.	6 limn. 60%	10 lim. (100%)*	6 lim. 60%	(6/10) 60%
Población total (1º año): 20 limneas				14/20 70%	(20/20) (100%)*	14/20 70%	(14/20) 70%

* (por desconocer datos de infestación se excluye Gi. NV del total).

° (Infestación controlada microscópicamente: 100%).

Tabla VI: Datos sobre las poblaciones de *L. truncatula* infestadas en los meses de verano de 1988 (primer año) y 1989 (2º año).

G. inf. (nº lim.)	Infes- tación.	1ª emisión	T. desar. larvario (días)	Superv. (nº limn) y (%)	Infest nº (a) y (%)	Emis. nº (b) y (%)	Exito inf. b/a (%)
Gi.Jn (22)	22 jun. 1989	10 ag.- -27 ag.	48-64 d.	9 limn. 50%	16 lim. 88.89%	9 lim. 50%	(9/16) 56.25%
Gi.Jl (7)	19 jul. 1989	29 ag.- -26 sp.	40-68 d.	5 limn. 71.43%	5 lim. 71.43%	4 lim. 57.14%	(4/5) 80%
GiAg1 (9)	12 ag. 1989	11 oct.- -21 oct	59-70 d.	8 limn. 88.89%	9 lim. 100%	8 lim. 88.89%	(8/9) 88.89%
GiAg2 (24)	1 sept. 1989	16 nov.- -28 nov	75-87 d.	10 limn. 41.67%	11 lim. 45.83%	10 lim. 41.67%	(10/11) 90.91%
Población total (2º año): 58 limneas				32/58 55.17%	41/58 70.69%	31/58 53.45%	(31/41) 75.61%
Gi.Jn (10)	4 agos. 1988	7 oct.	63 d.	8 limn. 80%	*	8 lim. 80%	*
Gi.Jl (12)	16 ag. 1988	7 oct.	51 d.	8 limn. 66.67%	*	8 lim. 66.67%	*
Población total (1º año): 22 limneas				16/22 72.73%	*	16/22 72.73%	*

* (% infestación desconocido).

Tabla O1: Datos sobre poblaciones de L. truncatula infestadas en otoño de 1988 (primer año) y de 1989 (2º año).

G.inf (nº lím.)	Infestación.	1ª emisión	T.desar. larvario (días)	Superv. (nº lím. y %)	Infest nº(a) y (%)	Emis. nº(b) y (%)	Exito inf. b/a (%)
GiSp1 (20)	16 oct. 1989	17 dic-27 dic	61-71 d.	18 lím. 90%	18 lím. 90%	17 l. 85%	(17/18) 94.44%
GiSp2 (10)	10 nov. 1989	15-16my (1990)	185-186 días	6/8º lím. 75%	10 lím. 100%	6/8º l. 75%	(6/8)º 75%
Población total (2º año): 30 límneas.				*(utilizadas 2 lím. en Gi.Sp2 para disección "in vivo")			
Gi.Ag (9)	10 sep. 1988	*	* (la infestación de otoño del primer año no llegó a provocar emisión de cercarias en ninguno de los grupos).				
GiSp1 (10)	3 oct. 1988	*					
GiSp2 (8)	4 nov. 1988	*					
Población total (1º año): 27 límneas.							

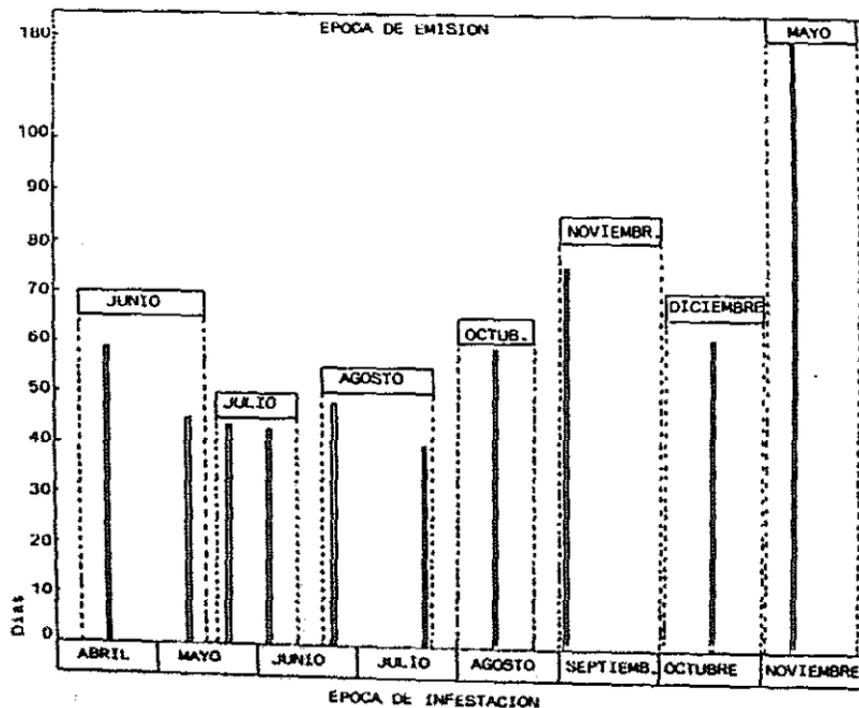


GRAFICO II : Tiempo de desarrollo larvario de F.hepatica en L.truncatula según el momento de infestación.

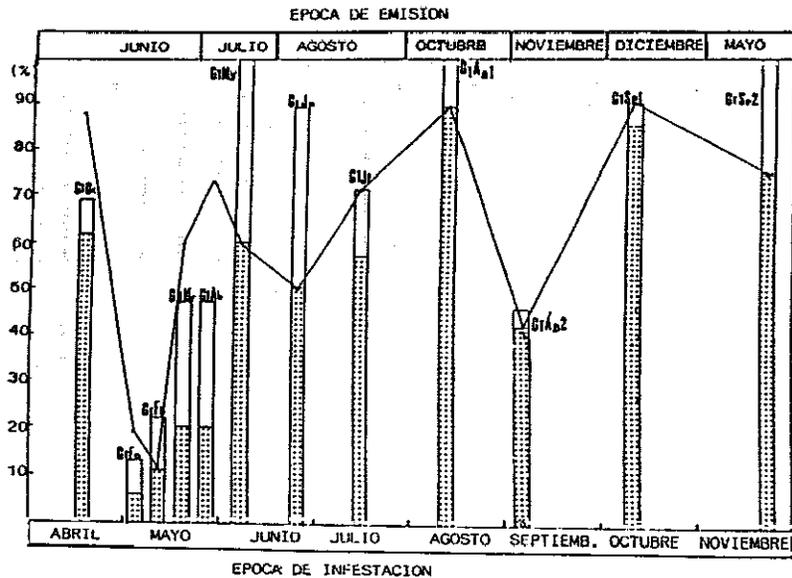


GRAFICO III : Datos sobre las poblaciones de *L. truncatula* según el momento en que fue provocada la infestación (— población viva, infestada en emisión, infestada que no emite cercarias).

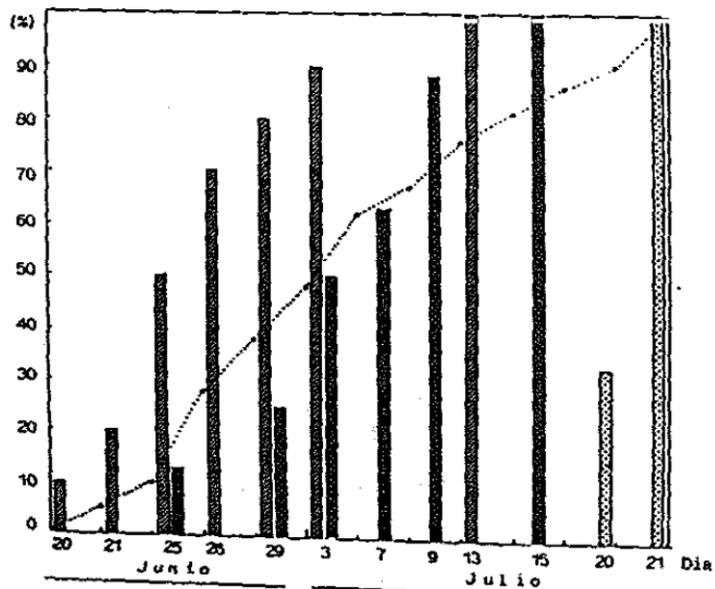


GRAFICO 1e : Dinámica del comienzo de emisión de cercarias en las poblaciones infestadas en abril (■), mayo (▒) y junio (▤), % de limnias que emiten cercarias del total de la población infestada en primavera.

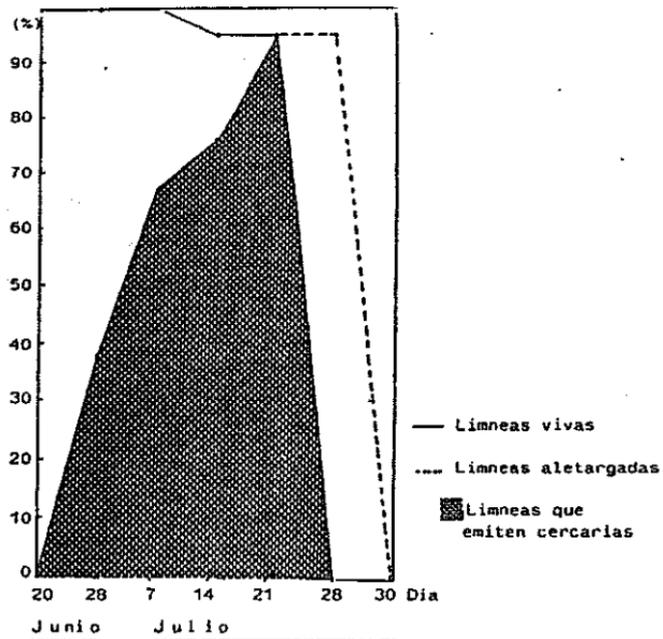


GRAFICO IIe : Datos sobre el comportamiento durante el periodo de emisión de las poblaciones de L.truncatula infestadas en primavera.

3.4.- ESTUDIO SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LAS METACERCARIAS.

El potencial infestante de las metacercarias procedentes de distintas épocas fue valorado en nuestro estudio mediante su capacidad de desenquistamiento a lo largo del año, según el modelo descrito en el capítulo Material y Métodos.

- Metacercarias de verano:

En el estudio realizado en uno y otro año sobre la capacidad infestante de las metacercarias de verano, los máximos porcentajes de desenquistamiento apenas sobrepasaron el 45%. Como se muestra en el Gráfico MI, el desenquistamiento inicial en las de julio del primer año (1988) sólo fue del 38%, mostrando una capacidad nula hacia mediados de agosto, a pesar de haber sido mantenidas inmersas en agua. De igual forma, el potencial inicial mostrado por las de junio y julio del año siguiente (1989), fue del 45% y 47% respectivamente, presentando durante julio una rápida pérdida de viabilidad, como demostraran los desenquistamientos efectuados a finales de este mes en las mantenidas en agua (15% en las de junio y 6% en las de julio), siendo la mortalidad prácticamente total a mediados de agosto (Gráf.MIIR). Las metacercarias procedentes del mes de agosto, inmersas en agua, mostraban una viabilidad del 46% a mediados de mes (Gráf.MIIR). Con un deterioro en 15 días similar al presentado por las de junio (compárense ambas trayectorias en Gráf.MIIR), quedó reducida su capacidad de desenquistamiento al 21% hacia finales de agosto. Dicha capacidad se mantuvo inalterable, sin embargo, durante los dos meses siguientes (septiembre y octubre), no acusando pérdida aparente hasta noviembre, detectada por el bajo porcentaje de desenquistamiento observado a comienzos de diciembre (7%).

Bajo condiciones ambientales de humedad relativa, la resistencia de las metacercarias procedentes de esta época no

superó los 15-20 días en ningún caso (ver sublotes J1 y Ag en Gráf.MIIs). Fueron por tanto las metacercarias de agosto mantenidas en agua las únicas con posibilidades de superar el verano con cierta capacidad infestante (21%), mostrándose las precedentes incapaces de sobrepasar el mes de julio en uno y otro año.

- Metacercarias de otoño a invierno:

Los resultados obtenidos con las metacercarias procedentes de los meses de otoño mantenidas en inmersión en agua, mostraron una extensión similar del potencial contaminante en ambos años, si bien con menores porcentajes durante el primero (1988), como a continuación veremos.

Anulada la capacidad infestante de las metacercarias de verano, no hubo durante el primer año nueva contaminación del medio hasta octubre, procedente de las líneas infestadas con los huevos del verano (junio y julio), cuya emisión se mantuvo hasta el mes de diciembre.

Como puede observarse en el Gráf.MI, los porcentajes de desenquistamiento encontrados en las de octubre y noviembre, al mes de permanencia en el medio ambiente en constante inmersión en agua, fueron del 63% y 64%, respectivamente. La pérdida de viabilidad fue gradual, mostrando desde mediados del mes de enero parecida supervivencia las metacercarias procedentes de los tres meses de otoño (44%, 32% y 36% en las de octubre, noviembre y diciembre respectivamente), reduciéndose aún más esta diferencia durante los meses siguientes (24%-29% hacia la 3ª sem. febrero y 15%-19% en la 3ª sem. abril). El agotamiento se hizo patente hacia principios de junio en los dos últimos lotes (metacercarias procedentes de noviembre y diciembre), quedando en las de octubre una capacidad residual (11%), manteniéndose de este modo un cierto potencial contaminante, al menos, hasta la

primera semana de junio, poco antes de comenzar las emisiones del segundo año (3ª sem. junio).

Los elevados porcentajes iniciales de desenquistamiento observados en las metacercarias procedentes de los meses de septiembre a diciembre del segundo año (79%-93%), unidos a la gran resistencia mostrada durante esta época por las mantenidas en agua (68%-89% a comienzos de diciembre, Gráf.MIIR) e incluso por las sometidas a las variaciones ambientales de H.R., indican el elevado riesgo que el otoño presenta para el hospedador definitivo.

Los desenquistamientos realizados durante los meses de invierno (enero a marzo), mostraron una mayor resistencia en la mantenidas en agua que bajo condiciones ambientales de H.R., si bien, en ambos casos fue alta, con un descenso de viabilidad progresivo, lento y similar en los diferentes orígenes.

Así, la capacidad de desenquistamiento aún se mantenía en un 70%, aproximadamente, hacia finales de enero en las inmersas desde octubre y noviembre en agua (Oc y Nv en Gráf.MIIR); porcentaje relativamente próximo al presentado para esa fecha por las procedentes de diciembre y enero bajo esas mismas condiciones de humedad (Dc y En en Gráf.MIIR), acusando, sin embargo, las homólogas de septiembre una importante pérdida de viabilidad para entonces (35% de desenquistamiento en Sp al 26 enero, Gráf.MIIR). A comienzos de marzo, las de noviembre, diciembre y enero mostraban superior viabilidad (40%-50%) a la presentada por las metacercarias más antiguas (15%-27% en Sp y Oc), según el Gráf.MIIR.

Bajo condiciones ambientales de humedad, las procedentes de septiembre y octubre acusaron un descenso más temprano (≤10% en Sp y Oc a finales de enero, Gráf.MIIRs) que las emitidas desde noviembre a enero, en las que el deterioro se produjo

principalmente en febrero, con capacidad de desenquistamiento hacia primeros de marzo del 24% (Nv), 12% (Dc) y 29% (En), según se muestra en el Gráf.MIIs.

Hacia comienzos de abril sólo conservaban una viabilidad relativamente importante las procedentes de noviembre y diciembre mantenidas en agua (34%-27% en Nv y Dc, Gráf.MIir), siendo prácticamente nula o residual (<10%) en el resto, bajo unas u otras condiciones de humedad, como se muestra en ambos Gráficos MIir y MIIs.

-Metacercarias de primavera y verano:

Queda por reseñar por último, la contribución a la contaminación del medio por parte de las metacercarias que en el segundo año fueron emitidas durante los meses de abril a julio por las limneas infestadas durante el otoño anterior.

A comienzos de abril, época en que el potencial contaminante se reducía a las metacercarias supervivientes de las emisiones más tardías del año anterior (noviembre y diciembre: ca. 30%), comenzaría un nuevo aporte de metacercarias al medio, con una viabilidad inicial del 83%. Como puede verse en el gráfico MIir, hacia finales de mayo la capacidad de desenquistamiento en las procedentes de abril y mayo, mantenidas en medio acuoso, no superaba el 50% (47% en Ab y 36% en My), sin rebasar el 20% las procedentes del año anterior (20% en Nv y 7% en Dc). Bajo condiciones ambientales de H.R. (Gráf.MIIs), la resistencia fue mucho menor, presentando sólo las emitidas en mayo cierta viabilidad (20%) hacia finales de ese mes.

La supervivencia de las metacercarias de este nuevo año se situaba hacia finales de junio entre el 25% y el 41% en las inmersas en medio acuoso (35% en Ab, 25% en My y 41% en Jn), sin

existir posibilidad de infestación en las mantenidas bajo condiciones ambientales de H.R. Para finales de julio de este último año (1990), sólo las de junio y julio que habían permanecido inmersas en agua retenían cierta viabilidad (18% en Jn y 29% en Jl) bajo el 100% de H.R., que era ya nula en el resto.

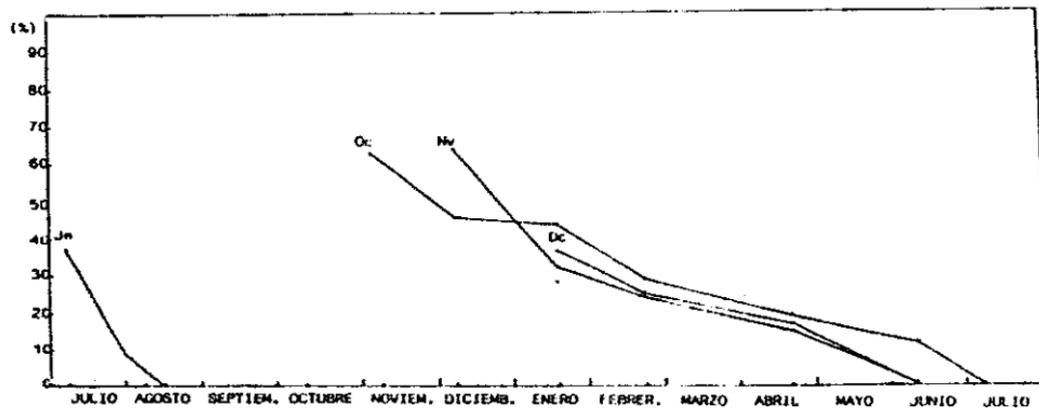


GRAFICO NI : Pérdida de viabilidad de las metacercarias procedentes del verano y otoño mantenidas constantemente en inmersión en agua.

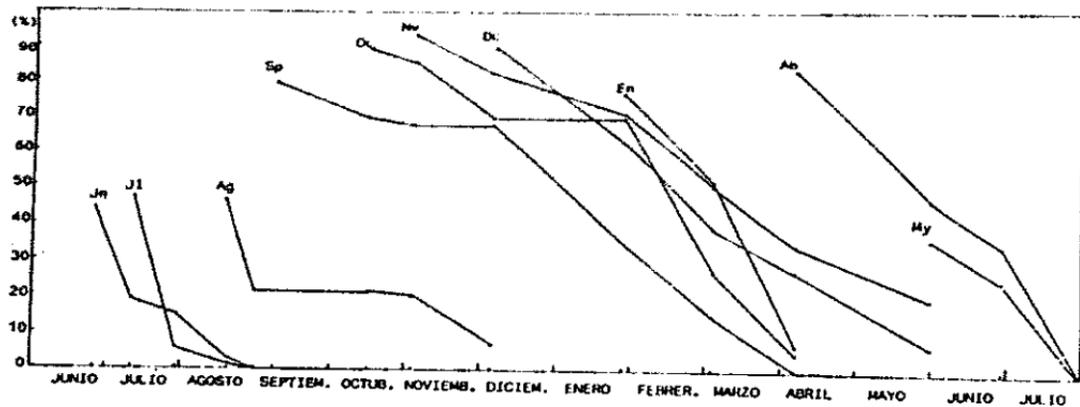


GRAFICO MIir : Pérdida de viabilidad de las metacercarias procedentes del verano, otoño, invierno y primavera mantenidas constantemente en inmersión en agua.

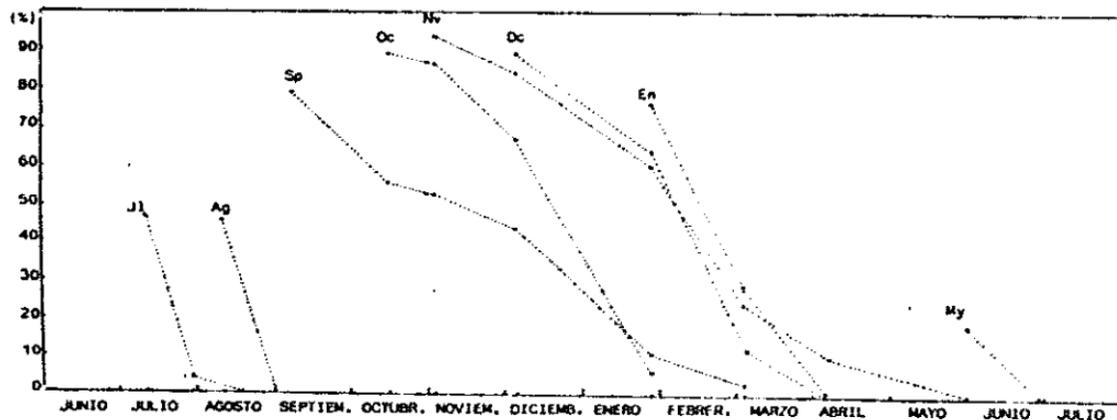


GRAFICO MIIs : Pérdida de viabilidad de las metacercarias procedentes del verano, otoño, invierno y primavera mantenidas bajo condiciones ambientales de humedad.

4.- DISCUSSION

4.-DISCUSION

Dentro del período térmico inhibitorio para el desarrollo larvario de *F.hepatica* ($T^{\circ} < 10^{\circ}C$), que en nuestra zona de estudio abarca de octubre/noviembre a febrero/marzo, las posibilidades de supervivencia presentadas por los huevos -primer estadio exógeno del ciclo biológico- excretados con las heces de su hospedador definitivo durante el otoño (octubre-diciembre) y, por tanto, de alcanzar con vida la época favorable para el desarrollo, son muy escasas y están condicionadas por el momento en que se produzca su liberación de la masa fecal y por las condiciones de humedad y temperatura que se presenten durante la época fría.

Los elevados índices de pluviosidad y H.R. que tradicionalmente caracterizan a la primera parte del otoño (octubre-noviembre), permitieron, bajo condiciones ambientales, conservar la suficiente humedad en el interior de las heces para mantener la viabilidad de los huevos, al menos, hasta la 3ª semana de noviembre, en proporción similar a la presentada por los incluidos en heces a saturación de agua. A este respecto, los datos de Rowcliffe & Ollerenshaw (1960) en Weybridge, apuntan similares tiempos de supervivencia (máximo: 7 semanas) en el interior de heces sin otra humedad que la ambiental, incluso protegidas de las lluvias, en esta época. Fueron estos autores quienes indicaron el requerimiento, para la supervivencia del huevo, de una película acuosa que lo recubra y no su completa inmersión en agua. Condición ésta que no pudo mantenerse con posterioridad a noviembre en el 2º año de nuestro estudio (1988), dada la particular escasez de lluvias y baja H.R. presentada en diciembre, lo que provocó la total mortalidad de los huevos incluidos en la masa fecal bajo condiciones ambientales, como demostró su incapacidad de desarrollo a temperatura constante de $25^{\circ}C$, ya a la primera semana de ese mes de diciembre.

Existiendo pues una elevada humedad durante el primer

periodo otoñal (octubre-noviembre), serán las bajas temperaturas que pueden presentarse ya a finales del otoño el principal factor limitante para la supervivencia de estos primeros huevos hibernantes en agua. Temperaturas inferiores a 0°C que serán la causa fundamental de la mortalidad observada durante el invierno, tanto en aquellos (en agua desde el otoño) como en los liberados de las heces a saturación de agua con posterioridad y hasta finales de enero. Existen múltiples trabajos de laboratorio sobre este particular, ya citados en nuestra revisión (Boray, 1969; Over, 1971, entre otros), que muestran el irreversible deterioro y la total incapacidad posterior de desarrollo o eclosión manifestada por los huevos sometidos a $T < 0^{\circ}\text{C}$ incluso durante cortos periodos de tiempo. Mortalidad que, sin embargo, no fue del 100% en nuestros resultados (los liberados inmediatamente al agua tras la excrección sobrevivieron en cierta proporción) lo que, sugerimos, se justifica por las variaciones térmicas diarias, incluso dentro del rango situado por debajo de los 10°C. Oscilaciones diarias cuyo efecto térmico total será menos marcado que el ejercido cuando las temperaturas $< 0^{\circ}\text{C}$ están incidiendo de forma constante.

Tal efecto letal de las temperaturas mínimas inferiores a 0°C queda también demostrado por la considerablemente menor proporción de huevos, excretados en otoño e inmediatamente liberados al agua, que llegaron a embrionar en la primavera del 2º año de estudio (1988-1989), frente al desarrollo alcanzado por los del primero (1987-1988), año mucho más moderado en el que las temperaturas mínimas mensuales no rebasaron negativamente aquel umbral (0°C) en todo el invierno. Esto, unido a la mayor H.R. ambiental existente en el primer año hasta finales de enero, explicaría también en parte la aparentemente superior longevidad (integridad morfológica) observada en ese año en los huevos que, inmersos en la masa fecal bajo condiciones ambientales, fueron liberados sucesivamente al agua, frente al rápido deterioro observado en los homólogos del año siguiente, si bien, el

desarrollo a medio ambiente fue nulo en ambos casos. En este punto, es importante considerar la frecuente falta de relación hallada entre la aparente integridad de los huevos en estado de órula (morfológicamente apreciada) y su viabilidad real (determinada en nuestro trabajo por su capacidad de desarrollo a T_s cte. 26°C), casi siempre inferior a la esperada. Cabe dudar de la eficacia del análisis morfológico para la determinación de viabilidad, si bien, debe tenerse en cuenta el efecto negativo que los cambios bruscos de temperatura pueden tener sobre aquella. Choques térmicos a los que, sin duda, fueron sometidos los huevos en nuestro estudio con el cambio de temperatura ambiental (bastante inferior a 10°C) a temperatura constante (26°C), sobre los que algunos autores han trabajado (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960; Díez Baños & Rojo Vázquez, 1976; Hope Cawdery y col., 1978; Vázquez Gómez y col., 1985), y cuyo efecto sobre la viabilidad aún se desconoce.

Puesto que, incluso bajo condiciones óptimas de humedad (100%), los huevos hibernantes de otoño que, por una u otra razón (excreción en terrenos encharcados, oportunidad de lluvias), puedan ser liberados al agua en el momento de excreción por el hospedador definitivo, van a sufrir menor mortalidad durante el invierno que los sucesivamente liberados con posterioridad, pese a mostrar una viabilidad similar (próximos % de desarrollo a T_s cte.) en el momento de su liberación de las heces, podríamos considerar que los primeros presentan una mayor resistencia a las temperaturas bajas extremas (< 0°C) que los que caen al agua con posterioridad al momento de excreción, por lo que su retención en la masa fecal, incluso a saturación de humedad, tendría un efecto negativo. La permanencia, sin embargo, en las heces durante los meses más crudos, garantizada su saturación de agua, confiere cierta protección a los huevos, como parecen demostrar los datos de mortalidad en heces y el desarrollo (aunque muy escaso) alcanzado por aquellos que fueron liberados en meses de temperaturas favorables para el mismo. A pesar de ello, fueron

los inmediatamente liberados al agua tras la excreción los menos afectados tras el invierno (mayor supervivencia incluso que en los mantenidos en heces hasta marzo) y, como consecuencia, los que mayores tasas de desarrollo alcanzaron en primavera. Llama por tanto la atención el diferente comportamiento detectado entre los huevos que no permanecieron en la masa fecal y los liberados de la misma tan sólo 15 días después de su excreción, o con posterioridad, durante esta época (octubre a diciembre), dada la paradójica ausencia de un posible efecto negativo de la permanencia en heces sobre aquellos -circunstancia incluso favorable cuando los huevos son excretados por el hospedador definitivo durante el invierno-, si disponen de agua a saturación. Ello podría sugerir la influencia de otros factores, a considerar aparte de los estrictamente climáticos, cuyo efecto sobre el huevo en estas circunstancias, no parece haber sido observado por otros investigadores y que, en nuestras experiencias, sólo se apreció en los huevos de otoño, cuya larga espera hasta el periodo térmico favorable para el desarrollo los expondría a mayor número de condicionantes a su supervivencia.

En áreas climatológicamente similares a la estudiada, la saturación de agua, requerida por los huevos incluidos en la masa fecal para sobrevivir en ella por tan prolongados periodos hasta la primavera, sólo será posible cuando las heces se encuentren en terrenos encharcados por retención de agua (charcas, arroyos, etc.), al no ser suficiente la humedad proporcionada por la elevada pluviosidad otoñal -a pesar de la ausencia de posibles pérdidas por filtración en las condiciones de nuestro estudio (recipientes con fondo de plástico)-.

Cabe considerar qué importancia podría tener la supervivencia de los huevos excretados en otoño en zonas muy húmedas que garanticen su total y constante saturación de agua mientras se encuentren incluidos en la masa fecal, cuya longevidad, que puede exceder de 6-7 meses, estará directamente

limitada por la crudeza invernal. De la liberación paulatina de estos huevos al agua dependería su posible contribución a la infestación del hospedador intermediario por periodos relativamente prolongados (hasta mediados de julio, en nuestro estudio, por parte de las liberaciones de la masa fecal efectuadas en abril, aunque en escasa proporción: $\leq 15\%$). Sin embargo, en los terrenos permanentemente anegados, la liberación total de los huevos de la materia fecal, aunque lenta y paulatina, no requiere más de dos meses (en las excreciones de vacuno probablemente menos que en las de ovino, empleadas por nosotros para conocer el ritmo de liberación de la masa fecal) que en condiciones de campo, sin duda se reducirá por la acción de depredadores, pisadas de animales, etc., quedando los huevos pues, antes expuestos a la crudeza invernal. Así, no será probable la permanencia de los huevos excretados en otoño en las heces hasta épocas tan avanzadas (aun considerando un arrastre progresivo de la de la masa fecal al agua) ni, por tanto, tan prolongada contribución con miracidios. Por todo lo expuesto y dado que sólo se observó desarrollo, de entre los liberados al agua antes de febrero, en los que lo fueron en el momento de excreción, la contribución con miracidios al medio por parte de los huevos excretados en otoño se producirá sólo en primavera y con poca intensidad.

Son, pues, durante el otoño, los huevos con oportunidad de llegar al agua al momento de excreción por el hospedador definitivo -circunstancia posible incluso en determinadas áreas de pastoreo de secano que puedan mantenerse con humedad, como vaguadas, márgenes de arroyos, desagües de manantiales, etc. (Simón Vicente & Ramajo Martín, 1985)- los únicos que parecen tener importancia epizootiológica, no sólo por su mayor capacidad de supervivencia a los rigores invernales -lo que les permite alcanzar mayores tasas de desarrollo- sino por ser los que, junto con los de septiembre del año anterior -como veremos más adelante- provocarán las primeras infestaciones de los moluscos

que pueden producirse en el año. Infestación "temprana" del caracol cuyo comienzo dependerá de la temperatura y que, según nuestros resultados de ambos años, podría tener lugar ya a finales de marzo en Madrid, uno o dos meses antes que en otras zonas más al norte de España o, en general, Europa. Así, los datos de que se dispone en nuestro país sobre algunas áreas de la submeseta norte -Salamanca- o los de Gran Bretaña, sitúan estas primeras infestaciones por abril-mayo (Simón Vicente, 1968; Ollerenshaw, 1959).

La temperatura delimitará, por tanto, el comienzo de tal infestación, así como su intensidad, por condicionar durante el invierno la supervivencia de los huevos. Así, es de esperar que los huevos excretados en otoño puedan tener una mayor importancia que en nuestro área en zonas más cálidas, como las meridionales en nuestro país, y a su vez, en climas más fríos, tengan un nulo papel en la transmisión de la fasciolosis, como parece ocurrir en León (Díez Baños & Rojo Vázquez, 1976) o en gran parte del norte de Europa (Escocia, Holanda, Dinamarca), a pesar de la discrepancia existente al respecto, siendo la hibernación de los huevos procedentes de otoño admitida por algunos (Urquhart y col., 1970; Hope Cawdery, 1975; Over & Dijkstra, 1975; Shaka & Nansen, 1979) y descartada por otros (Over, 1971; Ross, 1970; Díez Baños & Rojo Vázquez, 1976).

Mayor capacidad de resistencia mostraron los huevos excretados en los meses de invierno (enero y febrero) que, aunque condicionados por su rápida liberación de las heces (en enero las lluvias fueron particularmente escasas en el 2º año) o la constante saturación con agua de éstas, pudieron llegar con vida, en mayor proporción que los de otoño, al periodo térmico de medias diarias próximas o superiores a 10°C (marzo-abril), pese a las mínimas extremas (<0°C) aún presentes en enero (1989) y parte de febrero (1988 y 1989). Las tasas de supervivencia de los huevos excretados en enero e incluidos en heces en constante

saturación de agua, muy superiores a las presentadas por los de octubre y noviembre en igualdad de condiciones, apuntan mejores posibilidades de hibernación en los de invierno, aspecto ya considerado en el SE de Inglaterra por Ollerenshaw (1971a) y que podría justificarse, en nuestro estudio, por el menor tiempo de actuación de las temperaturas mínimas $< 0^{\circ}\text{C}$ y por el progresivo incremento térmico que se produce a partir de Enero. Esto sugiere que los huevos pueden soportar bajas temperaturas, incluso inferiores a 0°C (las mínimas en febrero del segundo año también rebasaron negativamente los 0°C durante 9 días), por periodos no muy prolongados, siendo el tiempo de exposición el que determinará su supervivencia. La alta longevidad en el interior de heces a saturación de agua observada en nuestro estudio en los huevos excretados en el invierno (máxima de 6-9 meses), concuerda con la indicada por Rowcliffe & Ollerenshaw (1960) bajo condiciones de campo, quienes aprecian supervivencia en los huevos, al menos, hasta 6 meses post-excreción.

La lenta disgregación de las heces excretadas en áreas encharcadas y el arrastre progresivo al agua de aquellas que lo fueran en las inmediaciones, circunstancia frecuente en determinadas zonas de pastos para el ganado, favorecen, por tanto, la liberación al agua de una forma lenta y discontinua. Dichos huevos podrían, de esta forma, provocar una paulatina pero constante liberación de miracidios desde finales de abril-comienzos de mayo hasta agosto, e incluso octubre en zonas permanentemente húmedas. Es probable, sin embargo, que en condiciones de campo, la permanencia de los huevos de invierno en las heces no rebase la primavera -por circunstancias ya comentadas al referirnos a los huevos de otoño- y que, por tanto, considerando además el efecto negativo de las elevadas temperaturas de julio sobre los huevos que se encuentran en las heces durante ese mes, su contribución con miracidios, que tendrá lugar desde mayo, no se prolongue más allá del mes de agosto. Eclosiones que, previsiblemente, en zonas de climas menos

templados, más al norte en nuestro país, no comenzarán hasta junio, como sucede en la franja norteeuropea (Ollerenshaw, 1970; Over, 1971; Over & Dijkstra, 1975; Hope Cawdery, 1975; Shaka & Nansen, 1979).

Donde el nivel de agua del terreno dependa exclusivamente de las condiciones climáticas (pluviosidad, EPT, HR), expuesto por tanto a periodos temporales de sequía, será la humedad el factor limitante, cuya carencia en nuestro área de estudio podrá acusarse ya en invierno (marzo en el primer año, enero en el segundo) y/o más previsiblemente, en la época estival (junio o julio hasta agosto o, incluso, septiembre en algunos años). En nuestro primer año de estudio, la pluviosidad fue escasa en marzo y julio y nula en agosto y septiembre; en el segundo, fueron incluso más secos los meses de diciembre y enero que los de agosto-septiembre, que presentaron el menor número de días con lluvia del verano. Es previsible, pues, que la contribución con miracidios al medio, por parte de estos huevos de invierno, quede limitada exclusivamente, en las zonas expuestas a los periodos temporales de sequía ambiental, a los excretados directamente en áreas encharcadas (arroyos, abrevaderos, etc.) en los que la liberación de las heces podrá durar dos meses como máximo, con eclosión de miracidios de mayo a julio, con una contribución, pues, mucho menor en intensidad y extensión que los de áreas permanentemente húmedas.

Próximamente las temperaturas medias de marzo a los 10°C, mes en el que ya podrán observarse huevos embrionados e incluso miracidios libres a finales del mismo (procedentes de las excreciones de otoño: octubre-diciembre), no presentan, sin embargo, los excretados este mes mayores posibilidades de desarrollo que las observadas en los que lo fueron en la primera parte del invierno (enero y febrero). Como aquellos, serán más favorecidos por una lenta disgregación de la materia fecal aunque también quedará limitada su supervivencia a una rápida liberación

de las heces en terrenos cuya humedad dependa exclusivamente de la pluviosidad y H.R. ambientales, dada la rápida desecación de la materia fecal aún experimentada en marzo.

Los meses de primavera (principalmente abril y mayo) junto con los de otoño (octubre y noviembre) son tradicionalmente los más lluviosos en nuestro clima, tanto en número de días con lluvia como en precipitación total mensual (abril, mayo y junio en el primer año; abril y mayo en el segundo). Es pues de esperar que, bajo condiciones ambientales de H.R., sean las heces excretadas en estos meses las que se mantengan por más tiempo con una elevada humedad y permitan a los huevos en ellas incluidos sobrevivir por periodos más prolongados. Huevos que, una vez liberados, tendrán grandes posibilidades de desarrollo, por estar dentro -o muy cerca- del periodo térmico favorable para el mismo. Si bien y como indicaron nuestros resultados, tal posibilidad dependerá no sólo de la cantidad de lluvia, sino también de las temperaturas y/o evaporación media diaria. Así, aunque en nuestro segundo año de estudio (1989) abril y mayo presentaron similar número de días con lluvia (12 en abril y 13 en mayo) y a pesar del mayor índice de precipitación total de mayo (52.2 mm en abril y 97.7 mm en mayo), fue muy superior la longevidad de los huevos de abril en la masa fecal bajo condiciones ambientales de H.R. (30 días en abril, 3 en mayo); diferencia que podría responder a las inferiores temperaturas (T° media en abril: 11°C frente a 18.4°C en mayo) y evaporación media diaria (1.8 mm en abril y 3.0 mm en mayo) del primer mes. Factores tanto más evidentes cuanto mayor sea la proximidad del verano: a la semana de excreción, en los de junio, la destrucción morfológica de los huevos era total en el interior de las heces (y aún sería más rápida en los de julio).

Presenta el último mes de primavera (junio), como contrapartida, las medias térmicas más adecuadas para agilizar la embrionación (media mín. $> 10^{\circ}$; media máx. $< 30^{\circ}\text{C}$), lo que, dada

la escasa mortalidad producida durante la primavera en el interior de la masa fecal en condiciones óptimas de humedad, posibilita elevados porcentajes de desarrollo con éxito en los huevos que, excretados en abril-junio, sean entonces liberados al agua, pudiendo completar su desarrollo en tan sólo 3-4 semanas (5-6 en abril-mayo), lo que confiere a este mes el mayor riesgo de infestación para el hospedador intermediario en nuestro área.

En zonas, por el contrario, exclusivamente dependientes de la climatología para mantener su balance hídrico y, por tanto, expuestas al marcado déficit húmedo estival, antes o después patente, la contribución con miracidios por los huevos excretados en primavera será más corta que en las de humedad permanente, y restringida a los meses de mayo y junio, siendo estos huevos responsables de la infestación "de primavera" del caracol que, en zonas menos cálidas (norte de europa), por no presentarse antes de junio, denominan "de verano" (Ollerenshaw, 1959 y 1971a).

No parece fácil que, en las condiciones climáticas de Madrid, los huevos aún en heces al comienzo del verano puedan superarlo en su interior con vida. Por una parte, no es probable que, aun en áreas de regadío, se puedan mantener las heces que no estén inmersas en una gran masa de agua (abrevaderos, charcas, etc.) con suficiente humedad de forma permanente, en un mes (julio) cuyas H.R. ambiental no sobrepasa el 38% y presenta los mayores índices de evaporación media diaria (4.2 y 5.6 mm, 1º y 2º año, respectivamente). Por otra, es significativa la rápida y total mortalidad producida en julio-agosto en los excretados en junio y julio; efecto letal atribuible a las elevadas máximas diarias propias de julio y agosto, que con frecuencia superan los 35°C en nuestro área (ej.: 17 días en julio y 10 en agosto, 1989), habiendo sido ya comprobada la destrucción por altas temperaturas (>30°C) en trabajos de laboratorio por diversos autores (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960; Al-Habbib, 1974; Díez Baños & Rojo Vázquez, 1976, entre otros).

parecen ser, por tanto, mucho más limitantes las temperaturas elevadas ($>30^{\circ}\text{C}$), que se presentan principalmente durante julio y agosto en Madrid, que las temperaturas mínimas $<0^{\circ}\text{C}$ del invierno, para la supervivencia del huevo en el interior de las heces, incluso a saturación de agua. Por el contrario, en áreas de veranos más frescos, como el SE de Inglaterra, donde las temperaturas máximas no superan los 30°C , la supervivencia de los huevos pueda rebasar las 10 semanas en el interior de la materia fecal a saturación de agua o, incluso, mantenerse durante cinco bajo condiciones ambientales de humedad (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960).

Las elevadas temperaturas de julio que se presentan en Madrid, no impedirán, sin embargo, un importante y rápido desarrollo en los huevos liberados con vida en este mes, con independencia de su antigüedad -circunstancia que compensará el rápido deterioro de los atrapados en la masa fecal-, siendo, por tanto, elevado el riesgo de infestación "temprana" de verano del molusco, aunque sólo bajo condiciones de abundante riego artificial o de índole no climática. Infestación en la que podrán también participar los huevos excretados a finales de junio y julio, única contribución posible de estos huevos que, aunque estrictamente restringida a su rápida -casi inmediata en julio- liberación de la masa fecal, será corta pero intensa. En países con elevada humedad estival, como Inglaterra u Holanda, son los meses de julio a agosto los de mayor riesgo de infestación para el molusco, por permitir, no sólo los menores tiempos de desarrollo para el huevo, sino una mayor supervivencia de los mismos (Ollerenshaw, 1971a y 1971b; Over, 1971).

Superado julio y a pesar de las elevadas temperaturas aún presentes durante el mes siguiente (máximas $> 30^{\circ}\text{C}$), presentan sin embargo los huevos excretados en agosto una gran resistencia que les permitirá, sólo en zonas permanentemente inundadas,



prolongar su supervivencia más allá del verano. Huevos cuya liberación de las heces en agosto provocará la infestación "tardía" de verano (durante agosto y gran parte de septiembre) y podrán, junto con los excretados en septiembre, prolongar, por progresiva liberación de la masa fecal antes del comienzo del otoño, el período de riesgo de infestación para los moluscos hasta octubre-noviembre ("infestación otoñal"), siempre que las temperaturas medias diarias en estos primeros meses de otoño lo permitan, lo que es probable en nuestro área.

Esta infestación otoñal, a cargo de los huevos con oportunidad de ser liberados antes del comienzo del otoño, será siempre posible -en años de otoños moderados- en los terrenos donde la orografía o la irrigación artificial permitan su encharcamiento durante agosto y septiembre, facilitado por la elevada pluviosidad que en este último mes pueda presentarse.

De la intensidad de lluvias en septiembre, bastante variable en Madrid de unos años a otros, dependerá toda posible infestación "otoñal" del caracol en las áreas cuya humedad dependa de la climatología, a la que no podrán contribuir los excretados en agosto (mes de elevada sequía) ni los liberados en octubre (excretados en septiembre y/o octubre). Aun en otoños templados que permitan la embrionación de los huevos liberados a comienzos de octubre, no llegarán a eclosionar en el mismo año y lo harán en la primavera del siguiente.

Respecto al diferente comportamiento observado en el desarrollo de los huevos liberados en octubre, según su procedencia (septiembre u octubre) -embrionación durante este mes de octubre de 1989 en los procedentes de septiembre, no observada en los excretados en octubre en los años anteriores (1987 y 1988)-, cabe señalar que en el último año (1989), en el que no se estudió el desarrollo de los huevos excretados en octubre, las temperaturas ($T_{\text{máx.}}$ 22.5°C y $T_{\text{mín.}}$ 9.5°C) fueron

más elevadas que en los anteriores, lo que pudo facilitar la embrionación observada. Es posible, también, que en los excretados en septiembre la segmentación ya hubiera comenzado antes de su liberación al agua, facilitando su total desarrollo antes de que las temperaturas fueran inferiores a los 10°C.

La humedad permanente del terreno presenta un riesgo añadido, pues, no sólo permite al desarrollo en ese mismo año de los huevos liberados al agua hasta mediados de septiembre, sino la posibilidad de hibernación de los huevos que, excretados en septiembre, sean sucesivamente liberados durante la última mitad del mes y que podrán incluso hibernar ya embrionados, circunstancia ya observada por Ollerenshaw (1971a) en Inglaterra. Embriones hibernantes que, con las primeras elevaciones térmicas por encima de los 10°C, ya posibles en marzo-abril en la zona de estudio, podrán contribuir con los huevos excretados en otoño a la infestación "temprana" de primavera de los moluscos al año siguiente.

Hibernación en completo desarrollo del huevo que, a la vista de nuestros resultados, parece conferir al parásito mayores garantías de supervivencia al invierno, circunstancia también observada en estudios de laboratorio por Alunda Rodríguez (comunicación personal). A este respecto, también en tricostrongilidos se ha apreciado una mayor resistencia a las condiciones ambientales adversas en huevos embrionados que sin embrionar (Levine, 1978) o en los coquistes esporulados del género *Eimeria* frente a los que están sin esporular (Pérard, 1926) -aunque en este caso, el parámetro para la determinación de viabilidad fue la aparición de los coquistes-, así como la ineficacia de determinados agentes desinfectantes, como el formaldehído, frente a los coquistes ya esporulados, pese a destruir los no segmentados (El-Moukdad, 1976).

La marcada dependencia de la humedad que el primer estadio

del ciclo biológico presenta, disminuye un tanto una vez tiene lugar la infestación del hospedador intermediario -*Lymnaea truncatula*, en nuestras latitudes-, dada la gran capacidad de adaptación que esta especie de molusco, de hábitos anfibios, presenta a los periodos más o menos intermitentes de sequía (Kendall, 1949b y 1965; Ollerenshaw, 1971a). Situación a la que el caracol se adapta mediante su letargo temporal y permite mantenerse vivo al parásito en su interior, en espera de la elevación del nivel hídrico del hábitat para continuar su desarrollo, cuya duración, por tanto, queda condicionada por la mayor o menor prolongación de dichos periodos secos.

Pero incluso bajo condiciones permanentes de humedad, son notables las diferencias encontradas entre unas épocas y otras sobre el tiempo requerido por el parásito para su maduración, en esta fase del ciclo intramolusco y sobre su comportamiento. Presenta así mayor interés, el estudio de la temperatura, de cuyo efecto, más o menos directo, sobre el parásito, dependerá la extensión de los periodos de riesgo para el hospedador definitivo.

Así, destaca en nuestros resultados la extensión considerable del desarrollo en las infestaciones más tempranas de primavera, efectuadas en la segunda mitad de abril (76 días en 1988; 59-82 en 1989) frente al tiempo requerido para la emisión de las primeras cercarias en las infestaciones sucesivas de mayo (56 d., 1988; 44-65 d., 1989) y primeros días de junio (43-44 d., 1989). Acortamiento en los tiempos de maduración que respondería al gradual aumento de las temperaturas, tanto mínimas (<10°C en abril y >10°C en mayo) como máximas (<25°C en mayo y >25°C en junio) en ambos años. A su vez, la considerable prolongación del desarrollo observada en las infestaciones producidas desde agosto (51-70 días) y la inhibición del desarrollo observada ya en la infestación de septiembre (1988) o en la de noviembre (1989), serían igualmente consecuencia del progresivo descenso térmico

acusado desde septiembre (T^a mín.: 18°C y 19°C en agosto; 12°C y 13°C en septiembre; 8°C y 10°C en octubre y 4°C y 9°C en noviembre, respectivamente en 1988 y 1989).

Resultados que concuerdan con el rango de desarrollo establecido para esta fase del C.B. (10-28°C) en *L. truncatula* (Kendall, 1965) -con posibilidades de ampliación del límite térmico superior, en función de la resistencia del molusco (Boray, 1963a y 1969)-, y que confirman el incremento de velocidad en el desarrollo que se observa a temperaturas constantes con la elevación térmica dentro de este rango (Kendall, 1965; Ollerenshaw, 1971a; Nice & Wilson, 1974; Al Habbib, 1974).

Parece, sin embargo, menos marcado el efecto del incremento térmico sobre el tiempo de desarrollo bajo condiciones ambientales que cuando las temperaturas actúan de modo constante. La duración de los tiempos de desarrollo intramolusco, muy superior siempre en nuestro estudio a la observada en los trabajos a temperaturas constantes (Kendall, 1965; Ollerenshaw, 1971a; Nice & Wilson, 1974; Al Habbib, 1974), sólo en parte atribuible al posible desfase existente entre la maduración de las cercarias y su emisión (no considerado por estos autores), podría explicarse por las oscilaciones térmicas diarias, así como por un posible efecto inhibitorio inducido por las temperaturas superiores a 30°C (Thomas, 1883; Wilson & Draskau, 1976; Rondelaud & Barthe, 1978a) propias de julio y agosto.

La temperatura no justifica satisfactoriamente, sin embargo, la falta de sincronía en el comienzo de emisión de cercarias encontrada en la mayoría de las poblaciones (con intervalos de 15-25 días), lo que, sin descartar un posible distanciamiento entre el momento de infestación de las lianas en cada población (pase a ponerse todos en contacto con los miracidios en el mismo día), atribuimos fundamentalmente a una desigual velocidad de

maduración de las redias, incluso bajo similares condiciones de T°, humedad y alimentación, por razones, quizás, inherentes al molusco, tales como la heterogeneidad de las poblaciones, apuntada por Anderson (1978), sin olvidar el efecto que el número de miracidios que haya penetrado pueda tener sobre la velocidad de desarrollo intramolusco y el intervalo más o menos largo que debe transcurrir desde la madurez de las cercarias hasta su emisión (Hope Cawdery & col, 1978).

Ofrecen los meses de primavera -finales de marzo a junio, en nuestro clima-, con la elevación térmica por encima de 10°C (umbral de desarrollo larvario, tanto dentro del huevo como del molusco), las primeras posibilidades de infestación del H.I. y la oportunidad al parásito de completar su desarrollo hasta la madurez de forma ininterrumpida en el interior de aquél. Desarrollo que, como ya hemos indicado, presenta distinta duración aun dentro de este periodo. Consecuencia de ello y puesto que en las primeras infestaciones ("tempranas") del molusco (marzo-abril), como en las sucesivas de primavera, la emisión no tendrá lugar hasta comienzos del verano (últimos días de junio), no consideramos atribuible la contaminación de los pastos con metacercarias en primavera -posible en nuestro clima- a la hibernación del huevo y, por tanto, menos aún en zonas más frías de nuestro país o en otras partes de Europa, en consonancia con las tesis mantenidas por Ollerenshaw (1959), Ollerenshaw & Smith (1969), Hope Cawdery (1975), Over & Dijkstra (1975), y Shaka & Nansen (1979), quienes descartan toda contaminación con cercarias hasta la primera mitad de julio, frente a lo sostenido por otros autores (Ross, 1970; Armour y col., 1970; Urquhart y col., 1970; Bruce y col., 1973). Tales infestaciones "tempranas" de primavera, no observadas en otras áreas de Europa, no harán en nuestra opinión sino aumentar la intensidad de contaminación de los pastos durante el primer mes estival (julio), que ya se vendrá produciendo desde abril por emisión de las líneas infestadas a finales de verano y comienzos del otoño del año

anterior.

Es particularmente en esta mes de Julio donde se hace más patente la influencia de la temperatura sobre esta fase del ciclo, al igual que lo hiciera sobre el huevo. El letargo acusado desde mediados de julio en la población en emisión para entonces (infestada en primavera) y su total mortalidad a finales del mismo, en ambos años, en nuestro estudio (a pesar de haberse mantenido en el último -1989- el óptimo nivel de agua en el hábitat), demuestra que son las elevadas temperaturas y no la ausencia de humedad las que limitan la viabilidad del parásito en esta época, por el efecto letal que tienen sobre el molusco con infestación madura, al contrario de lo que opinan Ollerenshaw (1970b; 1971c y 1973) y Leimbacher (1978) para las zonas de Europa meridional con humedad permanente. Efecto que, sin embargo, no se manifestó en nuestro estudio en las poblaciones sin infestar o con infestación reciente, pese a lo observado por Kendall (1953 y 1965), entre otros, para los que las temperaturas superiores a 25°C limitan grandemente la supervivencia de los moluscos no infestados. Esta mortalidad no se presentará, probablemente, en zonas de humedad permanente y veranos más frescos, por lo que estas poblaciones podrán provocar contaminación durante todo el verano. En las zonas en que el nivel de agua descienda considerablemente en verano, no será posible siquiera la emisión en el primer tercio estival.

En áreas más moderadas en que las temperaturas no sean letales para el caracol, podrá serlo la sequía, frente a la que la estivación del molusco ejercerá cierta protección. La estivación -inducida por la sequía- bajo las temperaturas extremas de julio en 1990 (34.9°C), sobre un grupo de líneas sin infestar, aún permitió el mantenimiento de un 50% con vida al cabo de un mes. Esta supervivencia explicaría la contaminación de los pastos de secano en septiembre en zonas en que las temperaturas estivales no sean tan elevadas, como Salamanca y

León, atribuida a la infestación de primavera por Simón Vicente & Ramajo Martín (1983) y Manga y col.(1987), que, probablemente, no habrá podido causar emisión de cercarias hasta ese momento.

La diferente duración del desarrollo observada en primavera se manifiesta aún más entre las infestaciones "temprana" y "tardía" de verano, efectuadas durante la 1ª y 2ª mitad del mismo y sólo posibles en hábitats con humedad permanente, pudiendo madurar la "temprana" ya en agosto, mientras que la "tardía" no podrá provocar emisión de cercarias hasta octubre. Así, las elevadas temperaturas propias de los meses de julio y agosto, no sólo no provocarán mortalidad en las poblaciones portadoras de la infestación "temprana" -producida antes de agosto-, como ya hemos indicado, sino que permitirán una rápida maduración del parásito (40-68 días en 1989), posibilitando la emisión de cercarias desde la segunda mitad del verano (mediados de agosto). Pese a no constituir un factor limitante para el parásito en esta fase del ciclo, la existencia o no de humedad durante julio va a condicionar completamente toda posibilidad de infestación "temprana" y por tanto, de emisión de cercarias en verano.

Las temperaturas propias de septiembre (máx.<30°C: 28.5°C y 27.5°C, mín.>15°C: 12°C y 13°C; 1988 y 1989), considerablemente inferiores a las de los anteriores meses de verano, justifican la prolongación del desarrollo larvario en las infestaciones producidas ya en agosto (51-63 d. y 59-70 d., 1988 y 1989); infestación "tardía" de verano, cuya emisión no podrá presentarse antes de octubre y que en zonas dependientes de la pluviosidad manifestará un retraso aún mayor, por inactividad del molusco, condicionado el comienzo de emisión por la llegada de las lluvias.

A la contaminación por metacercarias en otoño, en años moderados en nuestro área, o en zonas más templadas que la

nuestra, podrán contribuir también las infestaciones de septiembre, con posibilidad de emisión de cercarias desde noviembre, mientras que en países norteeuropeos dichas infestaciones no serán productivas hasta el año siguiente (Ollershaw, 1959, 1971a y 1971b; Shaka & Nansen, 1979). Dichos otoños moderados podrán originar en nuestra zona, infestación en octubre -"temprana" de otoño- productiva ya a finales de esa estación (en diciembre) e, incluso, otra infestación en la primera mitad de noviembre -"tardía" de otoño-, que no madurará hasta la primavera siguiente. La infestación otoñal, sin embargo, no ha sido contemplada para Europa y sólo existen reseñas para países tropicales (Boray, 1969; Lemma y col., 1985; Amato y col., 1986). Como pudimos comprobar durante el último otoño de nuestro estudio (1989), fueron las temperaturas máximas de octubre, aún por encima de los 20°C (22.5°C), junto con la particularmente templada 2ª mitad del otoño de aquel año, donde las mínimas de noviembre y diciembre no bajaron de 9°C y 7°C respectivamente, las que permitieron la maduración del parásito y su comienzo de emisión antes del invierno, a pesar de la considerable duración de su desarrollo (75-87 días en infestación de septiembre y 61-71 días en la de octubre).

Las emisiones de otoño en nuestro clima, serán siempre posibles en los terrenos natural o artificialmente encharcados de forma permanente, y se prolongarán además durante todo el otoño, independientemente de las temperaturas, dada la gran resistencia del molusco a las temperaturas frías (como demostraron nuestros resultados en el 2º año: 1988, a pesar de las temperaturas mínimas <0°C presentadas en diciembre). En estos terrenos, la posibilidad de emisión ya en la segunda mitad del otoño, por parte de las infestaciones de septiembre y octubre, no reviste demasiado interés, puesto que no hará sino aumentar la intensidad de contaminación de los pastos al final de dicha estación y en proporción relativamente escasa, teniendo en cuenta la regresión de densidad que acusará durante el otoño la población de moluscos

en ausencia de estivación (Moens, 1986) y, por tanto, la menor disponibilidad de hospedadores intermediarios para la infestación otoñal en zonas con humedad permanente. En los terrenos de secano, sin embargo, aunque toda infestación dependerá de la pluviosidad de septiembre (variable en Madrid según los años), quedando la emisión otoñal condicionada por las temperaturas de octubre y noviembre, la reactivación otoñal de los moluscos estivantes con el encharcamiento de los hábitats originará nuevas generaciones (Kendall, 1949b; Ollerenshaw, 1959) y, por tanto, mayor disponibilidad de hospedadores intermediarios en octubre, pudiendo aumentar considerablemente la emisión de cercarias en diciembre en años templados.

Con el descenso de las temperaturas medias por debajo de los 10°C -umbral de desarrollo larvario- (producido en nuestro estudio ya en noviembre en 1988 y no hasta enero en 1990), tendrá lugar la inhibición larvaria. De la duración de la época fría dependerá la prolongación del estado de latencia que, en trabajos de laboratorio, se ha apreciado, puede ser de uno y hasta dos años (Boray, 1963a) y que bajo las condiciones de nuestro último año de estudio (1990) retrasaría el comienzo de emisión hasta mayo en la población infestada en noviembre (6 meses p.i.) y provocaría el cese de emisión durante enero y febrero en las poblaciones infestadas entre julio y octubre.

La escasa o ausente emisión cercariana invernal no podrá atribuirse a la inactividad del molusco, que ocurre en zonas más frías de nuestro país desde noviembre a febrero (Simón Vicenta, 1968), sino a un mecanismo de inhibición parasitaria. Como nuestros resultados muestran, esta inhibición del desarrollo larvario está inducida por las temperaturas inferiores a 10°C, en consonancia por lo indicado por otros autores (Kendall & McCullough, 1951; Al Habbib & Grainger, 1983) y el cese de emisión por las temperaturas inferiores a 0°C.

El éxito de dicha hibernación estará condicionado por la supervivencia del molusco a las temperaturas frías y dependerá, por tanto, de la crudeza de los inviernos. Así, las temperaturas mínimas $<0^{\circ}\text{C}$ de los meses de diciembre de 1988 y enero de 1989, resultaron letales para toda la población de moluscos infestada, pero no así en la no parasitada; nuevamente se aprecia el efecto perjudicial que el letargo inducido por la T^a provoca en el molusco, y la considerablemente inferior resistencia de la población parasitada. Por el contrario, la ausencia de mínimas $<0^{\circ}\text{C}$ en el invierno de 1989/90 permitió la supervivencia de toda la población parasitada, tanto con infestación madura como inmadura, hasta la primavera siguiente.

Esta hibernación, considerada como mecanismo de adaptación del parásito para sobrevivir durante el invierno, suficientemente demostrada en países de climas templados y cálidos (Boray, 1969), presenta para la mayoría de los autores un escaso interés epizootiológico en toda la franja norteeuropea (Dinamarca, Irlanda, Escocia, Holanda,...), como también opinan Simón Vicente & Ramajo Martín (1983) y Manga y col. (1987) para la Submeseta Norte en España. Sin embargo, en nuestro área de estudio ha demostrado ser la única responsable de la contaminación reciente de los pastos en primavera.

Emisión primaveral que, en años de otoños moderados, más frecuentes en nuestra zona, podrá comenzar, como ocurrió en nuestro estudio (1990), ya en marzo (temperaturas medias $>10^{\circ}\text{C}$), por parte de las poblaciones con infestación ya madura desde el año anterior, entre las que estarían incluidas, aunque contribuyendo sólo durante ese mes, las infestadas en el verano anterior en los terrenos permanentemente encharcados.

Por el contrario, en zonas más frías, la emisión no tendrá comienzo hasta mayo, como en Salamanca (Simón Vicente, 1968; Simón Vicente y Garmendia, 1974; Simón Vicente y Ramajo Martín,

1985) o sur y sureste de Inglaterra (Ollerenshaw, 1959 y 1971a), por parte de la infestación "hibernante", que requiera de temperaturas próximas a los 20°C para su reactivación (Boray, 1963a), como pudimos comprobar en nuestro trabajo (Tª media en mayo, 1990: 19°C), no extendiéndose más allá del mes de junio, en consonancia con las observaciones de Ollerenshaw (1971a), entre otros.

El sincronismo observado, tanto en el comienzo de emisión (15 y 16 de mayo) como en el letargo y desaparición de esta población hibernante tan sólo cuatro semanas después, en un mes-junio- donde aún las máximas apenas rebasan los 30°C, así como la mortalidad producida en julio del año anterior (1989) en la población con infestación madura de primavera, sugiere que no todas las poblaciones van a afectarse en igual medida por las temperaturas, lo que parece imprimir mayor interés a la época en que tiene lugar la infestación. A su vez, los menores índices de infestación observados en las producidas durante los primeros meses de primavera (abril y mayo) frente a los de la infestación de junio y la hibernante, sugieren una menor capacidad infestante en los miracidios procedentes de huevos excretados en las épocas frías, en consonancia con las tesis de Díez y Díez (1981), lo que apunta nuevamente a la mayor importancia de la hibernación del parásito intramolusco frente a la del huevo.

Será la supervivencia de las metacercarias la que determine las épocas de riesgo de infestación para el hospedador definitivo en ausencia de emisión por los moluscos, aunque debe tenerse en cuenta la tesis mantenida por Boray y col. (1969). La imposibilidad de infestación de verano del caracol en los terrenos carentes de otro aporte hídrico aparte de la pluviosidad, unida a la rápida pérdida de viabilidad de las metacercarias procedentes de la primavera -mayo y junio- en estas zonas (total mortalidad para finales de junio en nuestros resultados, 1990), excluya todo riesgo de infestación para el

H.D. durante el verano y parte del otoño (de julio a octubre) en terrenos de humedad temporal.

Tampoco en los pastos de regadío será elevada la contaminación con metacercarias durante los primeros meses de verano (julio-agosto); la menor viabilidad inicial apreciada en nuestro estudio en las metacercarias procedentes de las infestaciones "tempranas" de verano frente a la de las originadas por las infestaciones posteriores viene a corroborar el efecto negativo que sobre éstas produce un desarrollo larvario intramolusco a $T^{\circ} > 23^{\circ}\text{C}$ (T° media en julio y agosto: 23 y 25°C en 1988; 28 y 27°C en 1989), ya señalado por Boray (1964), Tagle (1944, cit. por Cordero del Campillo, 1966) y Datvia (1956, cit. por Cordero del Campillo, 1966). Este hecho, unido al rápido deterioro producido en estos meses, tanto en las metacercarias mantenidas en agua como en las expuestas a la desecación, demuestra que son las elevadas temperaturas las que reducen al máximo el peligro de infestación para el hospedador definitivo durante la primera parte del verano (julio-agosto), en esta zona de España y en aquellas más al sur.

Sin embargo, el mantenimiento de las emisiones a lo largo de los meses siguientes, que la humedad durante el verano garantiza en los terrenos de regadío, supone, dadas las moderadas temperaturas existentes ya en septiembre (Máx. $< 30^{\circ}\text{C}$ y mín. $> 10^{\circ}\text{C}$), un alto riesgo de infestación para el H.D., no sólo en los terrenos aún mantenidos permanentemente húmedos, sino también, como nuestros resultados mostraron, en los eventualmente carentes de aporte hídrico extra e, incluso, en ausencia de lluvias (viabilidad $> 50\%$ para finales de octubre en las metacercarias procedentes de septiembre, bajo condiciones de 50-55% de H.R. en septiembre y octubre, 1989).

Esta escasa dependencia de la humedad ante temperaturas moderadas, aún más evidente durante el otoño en nuestro estudio

(similar supervivencia en las mantenidas bajo un 55-82% de H.R. ambiental que bajo el agua durante el otoño en las procedentes de estos meses -octubre a diciembre-), refuerza los resultados de Enigk & Hildebrandt (1964, cit. por Boray, 1969) y presenta un gran interés epizootiológico, dada la elevada capacidad infestante que estas metacercarias presentan (los mayores porcentajes de desenquistamiento en nuestros resultados), lo que supone un elevado riesgo de infestación para el H.D. durante el otoño, tanto en terrenos húmedos como en los eventualmente secos.

La gran resistencia de las metacercarias a las temperaturas frías, incluso a la congelación durante prolongados periodos (Taylor, 1949; Shaw, 1932; Boray & Enigk, 1964), confirmada en nuestro trabajo por la supervivencia de las metacercarias de otoño a los meses de diciembre y enero en 1988 (mínimas de -2.5 y -2.9 °C), cuando toda la población parasitada de moluscos quedó extinguida, descarta las hipótesis sostenidas por Pecheur (1967) en Bélgica y Craig-Hoover y col. (1984) en Idaho e indica, a nuestro parecer, que es esta fase del ciclo biológico la que mayores posibilidades de supervivencia durante el invierno presenta y serán las metacercarias emitidas en otoño, por tanto, las responsables de la infestación del hospedador definitivo al comienzo de la primavera en esas zonas de inviernos crudos.

En zonas de inviernos más moderados, como es, con frecuencia nuestro área de estudio (mínimas >0°C), las posibilidades de supervivencia en invierno son aún mayores, como mostraron nuestros resultados en el invierno de 1990. En estas zonas, los años de otoños templados, como fue el de 1989, posibilitan además la existencia en primavera de poblaciones con infestación madura desde el otoño, lo que implica una intensidad de contaminación en los pastos durante los meses de marzo-abril, mayor de la que normalmente se atribuye a esta época. Sin embargo, con el progresivo incremento térmico producido durante estos meses, el descenso en la viabilidad se acelera (Ollerenshaw, 1959 y 1971;

Over & Dijkstra, 1975; Shaka & Nansen, 1979), incluso en las mantenidas permanentemente húmedas, como nuestros resultados muestran, por lo que su contribución a la contaminación de los pastos será para mayo irrelevante. Mes en el que podrá comenzar la emisión procedente de la infestación "hibernante," responsable de la prolongación de la contaminación de la hierba hasta junio.

De este modo, en Madrid, en los terrenos con humedad permanente, en los que es posible la emisión de cercarias en primavera y comienzo del verano y desde finales del mismo hasta diciembre, el mayor peligro de infestación para el hospedador definitivo se presentará desde septiembre a marzo -en consonancia con las épocas en que se han observado brotes de fasciolosis aguda y subaguda en zonas de regadío de la provincia de Salamanca (Simón Vicente & Ramajo Martín, 1983)- y, en años templados, podrá prolongarse hasta junio. En terrenos con humedad temporal, con posibilidad de emisiones de cercarias sólo en primavera y de noviembre a diciembre, existirá mayor peligro de infestación para el hospedador definitivo desde noviembre a febrero/marzo, sin descartar los posibles brotes que puedan originar las contaminaciones de primavera, debidas a la infestación de otoño del caracol, en años templados.

5.- CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

1ª. El elevado requerimiento hídrico de los estadios de vida libre de Fasciola hepatica hace de la humedad el factor crítico en la supervivencia del huevo, limitada a la constante saturación con agua del microhábitat y, a su vez, condicionada por la temperatura del mismo. Las temperaturas de Madrid permitirán el desarrollo del huevo desde abril a octubre y, en algunos años, incluso en marzo y noviembre.

2ª. La letalidad de las temperaturas inferiores a 0°C y superiores a 30°C, limitará las posibilidades de desarrollo de los huevos excretados por el hospedador definitivo durante los meses de otoño y primer tercio estival (de finales de junio a finales de julio), a aquellos inmediatamente liberados de la masa fecal al agua, lo cual sólo podrá suceder cuando la excreción tenga lugar en zonas encharcadas, cuya eventualidad condicionará toda posibilidad de infestación "temprana" de primavera del molusco (de finales de marzo a finales de abril, en nuestro clima) y restringirá la infestación "temprana" de verano (de finales de junio a finales de julio) a las áreas de regadío.

3ª. Los huevos excretados durante el invierno, primavera y segunda mitad del verano (agosto y septiembre) podrán sobrevivir durante largos periodos en la masa fecal, siempre que ésta mantenga un elevado nivel hídrico, lo cual no parece posible en los terrenos de secano, dada la escasa humedad existente durante gran parte del invierno y verano en Madrid, pero en los pastos permanentemente anegados, supone elevados niveles de infestación desde mayo hasta octubre.

4ª. Bajo las condiciones climatológicas de Madrid, sólo existirá riesgo importante de infestación del molusco en los terrenos de secano durante los meses de mayo y junio (infestación de primavera). De la presencia de lluvias en septiembre y/o la prolongación de las temperaturas favorables para el desarrollo durante los primeros meses de otoño dependerá la posibilidad de infestación "tardía" de verano (en septiembre) y la otoñal (octubre-noviembre) en estas zonas.

5ª. La total mortalidad producida a finales de julio en las poblaciones de moluscos con infestación madura, limitará la emisión de cercarias provocada por la infestación de primavera al primer tercio estival. La posibilidad de emisión de cercarias durante el invierno puede descartarse en nuestro clima, no sólo por la mortalidad de los moluscos portadores del parásito en los años fríos, sino por la inhibición parasitaria producida en esta época incluso en años más templados. La crudeza térmica invernal, variable en Madrid de unos años a otros, condicionará, sin embargo, la supervivencia de los moluscos con infestación "hibernante" y, por tanto, la existencia de emisión cercariana en primavera, dada la imposibilidad de maduración de la infestación "temprana" de primavera antes del verano.

6ª. En los terrenos con humedad permanente, además de la emisión de cercarias en primavera y/o primera parte del verano, podrá producirse emisión de forma ininterrumpida desde agosto hasta diciembre. Excluida desde julio toda posibilidad de emisión en los terrenos dependientes de la pluviosidad, la contaminación con metacercarias en estos pastos quedará limitada a los meses de primavera y dos últimos de otoño, noviembre y diciembre, condicionada esta última cada año por la pluviosidad de septiembre y las temperaturas de octubre y noviembre.

7ª. La época de mayor riesgo de infestación para el hospedador definitivo en nuestro clima, abarca desde septiembre hasta marzo, en los terrenos permanentemente anegados. En estas zonas, la intensidad de contaminación de los pastos en primavera dependerá de la crudeza invernal y siempre será menos peligrosa para el ganado la época estival. Dada la rápida pérdida de viabilidad de las metacercarias procedentes de primavera (mayo y junio), en los terrenos con sequía temporal puede excluirse todo riesgo de infestación para el hospedador definitivo en el área de Madrid desde julio hasta octubre, presentándose los mayores índices de contaminación entre noviembre y febrero/marzo.

6.- BIBLIOGRAFIA

6.- BIBLIOGRAFIA

AL-HABBIB, W.M. & GRAINGER, J.N. (1983). The effect of constant and changing temperature on the rate of development of the eggs and the larval stages of Fasciola hepatica. Proceeding Royal Ireland Academie, 83B: 281-290.

AMATO, S.B.; REZENDE, H.E.B. DE; GOMES, D.C.; SERRA FREIRE, N.M. DA. (1986). Epidemiology of Fasciola hepatica infection in the Paraba river valley, Sao Paulo, Brasil. Veterinary Parasitology, 22 (3/4): 275-248.

ANDERSON, R. (1978). Population dynamics of snail infection by miracidia. Parasitology, 77: 201-224.

ARMOUR, J.; URQUHART, G.M.; JENNINGS, F.W.; REID, J.F.S. (1970). Studies on ovine Fascioliasis II. The relationship between the availability of metacercariae of Fasciola hepatica on pastures and the development of the clinical disease. Veterinary Record, 86: 274-277.

ARMOUR, J. (1975). The epidemiology and control of bovine fascioliasis. Veterinary Record, 96: 198-201.

BARNARD, C.J. (1990). Parasitic relationship. En: Barnard, C.J. & Behnke, J.M. (edts.). Parasitism and Host Behaviour. Taylor & Francis, London. pp: 1-33.

BARTHE, D. & RONDELAUD, D. (1986). Premières études sur la susceptibilité de trois espèces de Physidae et de Bulinus truncatus a l'infestation fasciolienne. A propos de quelques observations histopathologiques. Bulletin de la Société Française de Parasitologie, 4 (1): 33-38.

BORAY, J.C. (1963). The ecology of Fasciola hepatica with particular reference to its intermediate host in Australia. Proceedings 17th World Veterinary Congress, Hanover, 1: 709-715.

BORAY, J.C. (1969). Experimental Fascioliasis in Australia. Advances Parasitology, 7: 96-210.

BORAY, J.C. & ENIGK, K. (1964). Laboratory studies on the survival and infectivity of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica metacercariae. Zeitschrift Tropenmedizin und Parasitologie, 15: 324-331.

BORAY, J.C.; HAPFICH, F.A.; ANDREWS, J.C. (1969). The epidemiology of fasciolosis in two representative endemic regions of Australia. Australian Veterinary Journal, 45: 549-553.

BORCHERT, A. (1964). Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza. 745 pp.

BOUIX-BUSSON, D.; RONDELAND, D. & COMBES, C. (1983). L'infestation de Lymnaea glabra Müller par Fasciola hepatica L. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 60: 11-21.

BOYCE, W.M. & COURTNEY, C.H. (1990). Seasonal transmission of Fasciola hepatica in North Central Florida. (U.S.A.). International Journal for Parasitology, 20: 695-696.

BRUCE, R.G.; ARMOUR, J.; CORBA, J. (1973). A further study of epidemiology of ovine fascioliasis in Scotland and its control using molluscicide. Veterinary Record, 92: 518-526.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1966). Las bases biológicas de la lucha contra Fasciola hepatica. Avigán, año XV, Nº 165: 8-19.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1974). Parasitic zoonoses in Spain. International Journal of Zoonoses, 1: 45-57.

CORDERO DEL CAMPILLO, M.; MARTINEZ GOMEZ, F.; ROJO-VAZQUEZ, F.A.; SIMON VICENTE, F.; RAMAJO MARTIN, V.; CARMONA CARMONA, E.; URIARTE ABAD, J.; TARAZONA VILAS, J.M. (1983). La intensidad del parasitismo en condiciones de clima mediterráneo: factores ligados al sistema de pastoreo. 34 Reunión Anual de la Federación Europea de Zootecnia, Madrid: 1-12.

CRAIG, T.M. & BELL, R.R. (1978). Seasonal transmission of liver flukes to cattle in the Texas Gulf Coast. Journal of American Veterinary Medical Association, 173: 104-107.

CRAIG HOOVER, R.; LINCOLN, S.D.; HALL, R.F.; WESCOO, R. (1984). Seasonal transmission of Fasciola hepatica to cattle in northwestern United States. Journal of American Veterinary Medical Association, 184 (6): 695-698.

CHRISTENSEN, N.; NANSEN, P.; FRANDSEN, F. (1976a). The influence of temperature on the infectivity of Fasciola hepatica miracidia to Lymnaea truncatula. Journal of Parasitology, 62: 698-701.

CHRISTENSEN, N. NANSEN, P; FRANDSEN, F. (1976b). Molluscs interfering with the capacity of Fasciola hepatica miracidia to infect Lymnaea truncatula. Parasitology, 73: 161-167.

DIEZ BAÑOS, M.A. & ROJO VAZQUEZ, F.A. (1976). Influencia de la temperatura en el desarrollo de los huevos de Fasciola hepatica L., 1758. Anales de la Facultad de Veterinaria de León, 22 (1): 65-75.

DIEZ BAÑOS, P.; SANCHEZ-ANDRADE, R.; MORRONDO-PELAYO, P. (1989). Estudio epidemiológico de la fasciolosis bovina en Galicia. VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres, 25-29 septiembre. pp 124.

DIEZ Y DIEZ, M. (1981). Influencia de la temperatura de incubación de los huevos de Fasciola hepatica sobre la capacidad de infestación de la primera fase larvaria en el molusco hospedador intermediario Lymnaea palustris. Hygia Pecoris. III (5): 39-59.

EL-MOUKDDAD, A.R. (1976). Effect of disinfectants on preparasitic developmental stages. I. (Effect on Eimeria oocysts). Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 63 (12): 399-405.

ESCUADERO DIEZ, A. (1970). Histopatología y relaciones Fasciola hepatica/Lymnaea truncatula y L. palustris en infestación experimental. Anales de la Facultad de Veterinaria de León, 16: 261 pp.

EURELEC, C.B. (1960). The influence of light and temperature on the development and hatching of the eggs of Fasciola hepatica. University of Philippines College of Veterinary Medicine Jubilee Commemorative Volume: 129-133.

GARCIA, A.L. & JUSTE, R.A. (1987). Helminthos parásitos de la oveja en el País Vasco. Revista Ibérica de Parasitología, Vol. Extraordinario: 105-113.

GEORGY, J.R. & GEORGY, M.E. (1990). Parasitology for Veterinarians. Fifth Edition. (Ed. W.B. SAUNDERS COMPANY). 412 pp.

GOLD, D. & GOLDBERG, M. (1973). Effect of light and temperature on hatching in Fasciola hepatica (Trematoda: Fasciolidae). Israel Journal of Zoology, 25: 178-185.

GOMEZ BAUTISTA, M. & LUZON PEÑA, M. (1989). Biología y epizootiología. En: Trematodosis hepáticas: Fasciolosis. C.L. BOVIS. Tratado de Veterinaria Práctica. Luzán 5, S.A. de Ediciones.

GOMEZ GARCIA, V.; PEINADO PELAEZ, M.; RODRIGUEZ OSORIO, M. (1989). Prevalencia y distribución de la fasciolosis animal en la provincia de Granada. VI Congreso Nacional y I Ibérico de Parasitología. Cáceres, 25-29 septiembre. pp 120.

GONZALEZ-LANZA, C.; MANGA GONZALEZ, Y.; DEL POZO-CARNERO, P.; HIDALGO-ARGÜELLO, R. (1989). Dynamics of elimination of the eggs of Fasciola hepatica (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. Veterinary Parasitology, 34: 35-43.

GOODALL, E.A.; McILROY, S.G.; STEWART, D.A.; MCCracken, R.M. (1989). An autoregressive multivariate model for fascioliasis. Proceedings, Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine: 1-12.

GRACIO, M.A.A. (1985). Contribución al conocimiento de los moluscos Gastropoda de las aguas dulces de Portugal. Distribución y bio-ecología de Lymnaea truncatula en algunos distritos. Revista Ibérica de Parasitología, 45: 9-14.

- HARRIS, R.E. & CHARLESTON, W.A.G. (1976). The epidemiology of Fasciola hepatica infections in sheep on a Lymnaea columella habitat in the Manawatu. New Zealand Veterinary Journal, 24 (1-2): 11-17.
- HODASI, J.K.M. (1972). The effects of Fasciola hepatica on Lymnaea truncatula. Parasitology, 65: 359-369.
- HODASI, J.K.M. (1976). The effects of low temperature on Lymnaea truncatula. Zeitschrift für Parasitenkunde, 48: 281-286.
- HOPE CAWDERY, M.J. (1975). Preliminary observations of the availability of infective metacercariae on reclaimed peat pastures in western Ireland. In: Facts and Reflections II. Workshop on Fascioliasis. Parasitol. Dept. Central Diergeskundig Institut, Lelystad, 1975. pp. 19-27.
- HOPE CAWDERY, M.J.; GETTINBY, G; GRAINGER, J.N.R. (1978). Mathematical models for predicting the prevalence of liver fluke disease and its control from biological and meteorological data. In: Gibson, T.E.(ed). Weather and Parasitic Animal Disease. Geneva. World Meteorological Organization, Tech. Note No. 159: 21-48.
- ITAGAKI, T.; FUJIWARA, S. MASHIMA, K.; ITAGAKI, H. (1988). Experimental infection of Japanese Lymnaea snails with Australian Fasciola hepatica. Japanese Journal of Veterinary Science, 50 (5): 1087-1090.
- JEPPE, M.W. (1933). Miracidium of the liver-fluke for laboratory work. Nature, 132: 171.
- JIMENEZ ALBARRAN, M. (1979). Estudios experimentales sobre la biología de Fasciola hepatica: 3º. Influencia del parasitismo sobre el crecimiento de Lymnaea (Galba) truncatula infestada con las fases larvarias de F. hepatica. Revista Ibérica de Parasitología, 39: 95-105.
- KAMIHARAKO, Y.; ITAGAKI, T.; ITAGAKI, H. (1986). The snail host of Fasciola sp. in Tempoku District of Hokkaido. Japanese Journal of Veterinary Science, 48 (2): 323-328.
- KENDALL, S.B. (1949a). Nutritional factors affecting the rate of development of Fasciola hepatica in Lymnaea truncatula. Journal of Helminthology, XXIII (3/4): 179-190.

- KENDALL, S.B. (1949b) Bionomics of Lymnaea truncatula and the parthenitae of Fasciola hepatica under drought conditions. *Journal of Helminthology*, XXIII (1/2): 57-68
- KENDALL, S.B. (1950). Snail hosts of Fasciola hepatica in Britain. *Journal of Helminthology*, XXIV (1/2): 63-64.
- KENDALL, S.B. (1953). The life history of Lymnaea truncatula under laboratory conditions. *Journal of Helminthology*, XXVII (1/2): 17-28.
- KENDALL, S.B. (1960). Epidemiology and control of Fascioliasis. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungarica*, X (1): 1-13.
- KENDALL, S.B. (1965). Relationships between the species of Fasciola and their molluscan host. *Advances in Parasitology*, 3: 59-98.
- KENDALL, S.B. & McCULLOUGH, F.S. (1951). The emergence of the cercariae of Fasciola hepatica from the snail Lymnaea truncatula. *Journal of Helminthology*, XXV (1/2): 77-92.
- KENDALL, S.B. & OLLERENSHAW, C.B. (1963). The effect of nutrition on the growth of Fasciola hepatica in its snail host. *Proceedings of the Nutrition Society*, 22 (I): 41-46.
- LEIMBACHER, F. (1978). Experience with the "Mt" system of forecasting fascioliasis in France. In: Gibson T.E. (ed). *Weather and Parasitic Animal Disease*. Geneva: World Meteorological Organization, Tech. note No. 159: 6-13.
- LEMMA, B.; GABRE-AB, F.; TEDLA, S. (1985). Studies on fascioliasis in four sites in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 18 (1): 29-37.
- LEVINE, N.D. (1978). The influence of Weather on the bionomics of the free-living stage of nematodes. In: Gibson T.E. (ed). *Weather and Parasitic Animal Disease*. Geneva: World Meteorological Organization, Tech. note No. 159: 51-57.
- MAGE, C. (1989a). Épidémiologie de Fasciola hepatica chez des jeunes bovins élevés sur les alpages de la Cerdagne (France). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 140: 1033-1036.

- MAGE, C. (1989b). Épidémiologie de l'infestation par Fasciola hepatica chez les bovins en Limousin (France). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 140: 407-411.
- MAGE, C.; THIBAUT, D.; RONDELAUD, D. (1989). Nouvelles données sur les hôtes intermédiaires de Fasciola hepatica L. dans les marais côtiers de Charente-maritime. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 140 (2): 129-133.
- MALONE, J.B. (1986). Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 2 (2): 261-275.
- MALONE, J.B.; LOYACANO, A.F.; HUGH-JONES, M.E.; CORKUM, K.C. (1984/85). A three-year study on seasonal transmission and control of Fasciola hepatica of cattle in Louisiana. *Preventive Veterinary Medicine* 3 (2): 131-141.
- MANGA, Y.; GONZALEZ, C.; HIDALGO, R. (1987). Dynamics of the Lymnaea truncatula (Mollusca, Bascommatophora) infection by Fasciola hepatica (Trematoda, Digenea) in the Porma basin (León, NW Spain). Abstract from Third Mediterranean Conference of Parasitology, Israel. p. 16.
- MEEK, A.H. & MORRIS, R.S. (1979). An epidemiological investigation of ovine fascioliasis (Fasciola hepatica) on both irrigated and non-irrigated pasture in northern Victoria. *Australian Veterinary Journal*, 55: 365-369.
- MILIAN SUAZO, F.; HERNANDEZ, E.F. & FRAGOSO SORIANO, G. (1989). Estudio epizootológico de la fascioliasis en la zona centro del Estado de Guerrero. *Técnicas Pecuarias de México*, 27: 41-47.
- MOENS, R. (1981). Les habitats de Lymnaea truncatula, hôte intermédiaire de Fasciola hepatica. *Revue de l'Agriculture*, 6: 1563-1579.
- MOENS, R. (1986). Observations sur le cycle évolutif de Lymnaea truncatula (Müller) sur des terrains propices à la fasciolose. *Proceedings of the 8th International Malacological Congress, Budapest, 1983.*: 169-174.

NANSEN, P. & SHAKA, S. (1975). Epidemiological studies on ovine fascioliasis in Denmark. In: Facts and Reflections II. Workshop on Fascioliasis. Parasitological Department of The Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad: 29-30.

NICE, N.G. & WILSON, R.A. (1974). Study of the effect of temperature on the growth of Fasciola hepatica in Lymnaea truncatula. Parasitology, 68: 47-56.

OLLERENSHAW, C.B. (1959). The ecology of the liver fluke (Fasciola hepatica). Veterinary Record, 71: 957-965.

OLLERENSHAW, C.B. (1966). The approach to forecasting the incidence of fascioliasis over England and Wales 1958-1962. Agricultural Meteorology, 3: 35-53.

OLLERENSHAW, C.B. (1967). Some observations on the epidemiology and control of Fascioliasis in Wales. In Second International Liver Fluke Colloquium, Wageningen: 103-125.

OLLERENSHAW, C.B. (1970a). Some aspects of the epidemiology of fascioliasis in Britain. Proceedings of The Malacological Society, London., 39: 238-243.

OLLERENSHAW, C.B. (1970b). Influence du climat sur le cycle évolutif de Fasciola hepatica en Grande Bretagne et observations sur l'influence du climat sur l'incidence de la fasciolose en France. Compte-rendu du Colloque sur la prévision des Maladies, Rambouillet: 17-37.

OLLERENSHAW, C.B. (1971a). Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. Veterinary Record, 88 (6): 152-164.

OLLERENSHAW, C.B. (1971b). The influence of the climate on the cycle of Fasciola hepatica in Britain with some observations on the relationship between climate and the incidence of fascioliasis in the Netherlands. In: Facts and Reflections. Symposium on Veterinary Parasitology, Parasitol. Dept., Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad: 41-63.

OLLERENSHAW, C.B. (1971c). Quelques aspects des relations entre le climat et l'incidence de la fasciolose en Europe. Les Cahiers de Médecine Vétérinaire, 40:303-319.

OLLERENSHAW, C.B. (1973). Considerazioni sulla epidemiologia della Fasciola hepatica in Italia. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, XX: 3-41.

OLLERENSHAW, C.B. (1974). Forecasting liver fluke disease. Reprinted from The effects of meteorological factors upon parasites, Symposium of the British Society for Parasitology, 12: 33-52.

OLLERENSHAW, C.B. & ROWLANDS, W.T. (1959). A method of forecasting the incidence of fascioliasis in Anglesey. Veterinary Record, 71 (29): 591-598.

OLLERENSHAW, C.B. & SMITH, P.L. (1969). Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. Advances in Parasitology, 7: 283-323.

OLSEN, O.W. (1947). Longevity of metacercariae of Fasciola hepatica on pastures in the upper coastal region of Texas and its relationship to liver fluke control. Journal of Parasitology, 33: 36-42.

OVER, H.J. (1971). The development of the relationship between Lymnaea truncatula and the larval stages of Fasciola hepatica. In: Facts and Reflections. Symposium on Veterinary Parasitology, Parasitol. Dept., Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad: 31-40.

OVER, H.J. & DIJKSTRA, J. (1975). Infection rhythm in fascioliasis. In: Facts and Reflections II. Workshop on Fascioliasis. Parasitol. Dept., Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad: 9-18.

OWEN, I. (1989). The epidemiology of fascioliasis in Papua New Guinea. Australian Veterinary Journal, 66 (2): 58-60.

PECHEUR, H. (1967). A few considerations on the cercariae and metacercariae of Fasciola hepatica. Second International Liver Fluke Colloquium, Dept. of Zool. Agric. Univ., Wageningen, The Netherlands: 148-149.

PEINADO PELAEZ, M.; GOMEZ GARCIA, V.; RODRIGUEZ OSORIO, M. (1989). Estudio epidemiológico de la fasciolosis en el ganado de la provincia de Granada. VI Congreso Nacional y I Ibérico de Parasitología. Cáceres, 25-29 de septiembre. pp 119.

PERARD, C.H. (1926). La prophylaxie des coccidioses. Revue Générale de Médecine Vétérinaire, XXXIV: 421-428.

REINA, D.; NAVARRETE, I.; HERNANDEZ, S.; HABELA, M. (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. II. Helmintos. Revista Ibérica de Parasitología, Vol. Extraordinario: 85-90.

ROBERTS, E.W. (1950). Studies on the life-cycle of Fasciola hepatica (Linnaeus) and of its snail host Lymnaea (Galba) truncatula (Müller) in the field and under controlled conditions in the laboratory. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 44: 187-206.

RONDELAUD, D. & BARTHE, D. (1978a). Arguments et propositions pour une nouvelle interprétation de l'évolution de Fasciola hepatica L. dans Lymnaea (Galba) truncatula Müller. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 53 (2): 201-213.

RONDELAUD, D. & BARTHE, D. (1978b). Etude histologique du développement de Fasciola hepatica chez Lymnaea truncatula et L. palustris infestées dès leur naissance. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie, 172 (6): 1194.

RONDELAUD, D. & BARTHE, D. (1987). Fasciola hepatica L.: étude de la productivité d'un sporocyste en fonction de la taille de Lymnaea truncatula Müller. Parasitology Research, 74 (2): 155-160.

ROSS, I.C. & McCAY, A.C. (1929). The bionomics of Fasciola hepatica in New South Wales and the intermediate host Lymnaea brazieri (Smith). Australian Council of Scientific and Industrial Research Bulletin, 43: 1-62.

ROSS, J.G. (1967). A further season of epidemiological studies of Fasciola hepatica infections in sheep. Veterinary Record, 80: 368-374.

ROSS, J.G. (1970). The Stormont wet-day forecasting system for fascioliasis. *British Veterinary Journal*, 126: 401-408.

ROSS, J.G. (1977). A five-years study of the epidemiology of fascioliasis in the north, east and west of Scotland. *British Veterinary Journal*, 133: 263-272.

ROWAN, W.B. (1956). The mode of hatching of the eggs of Fasciola hepatica. *Experimental Parasitology*, 5: 118-137.

ROWCLIFFE, S.A. & OLLERENSHAW, C.B. (1960). Observations on the bionomics of the egg of Fasciola hepatica. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 54: 172-181.

SAMPAIAO XAVIER, M.L.; MARTINEZ FERNANDEZ, A.; MATTOS DOS SANTOS, M.A. (1968). Susceptibility of some fresh water snails of Portugal an Spain to Fasciola hepatica. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, 14 (14): 239-255.

SHAKA, S. & NANSEN, P. (1979). Epidemiology of fascioliasis in Denmark. Studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages overwintering on pasture. *Veterinary Parasitology*, 5: 145-154.

SHAW, J.N. (1932). Studies of the liver fluke (Fasciola hepatica). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 81: 76-82.

SIMON VICENTE, F. (1968). Datos sobre la ecología de Lymnaea truncatula y evolución larvaria de Fasciola hepatica en una zona de regadío. *Revista Ibérica de Parasitología*, 28 (3): 333-348).

SIMON VICENTE, F. (1971). Fasciolosis hepática. Etiopatogenia. *Tribuna Veterinaria*, 14: 3-4.

SIMON VICENTE, F. (1979). Trematodos larvarios y sus moluscos hospedadores en Salamanca. *Revista Ibérica de Parasitología*, 39: 241- 250.

SIMON VICENTE, F. & GARMENDIA, J. (1974). Posibilidades de empleo del índice de la reserva de humedad para predecir la incidencia de fasciolosis en una región seca. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 32 (1/2): 1-2.

- SIMON VICENTE, F. & RAMAJO MARTIN, V. (1983). Fasciolosis aguda en regadíos del tramo medio del Tormes. Anales del Centro de Edafología Biología y Agricultura de Salamanca, IX: 383-393.
- SIMON VICENTE, F. & RAMAJO MARTIN, V. (1985). Principales problemas parasitarios ligados al pastoreo, en especial del ganado ovino en la provincia de Salamanca. En: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (editor). Las Parasitosis de los Rumiantes en Pastoreo en España. Comunicaciones I.N.I.A. Serie: Higiene y Sanidad Animal., 11.: 37-59.
- SMITH, G. (1987). The relationship between the density of Fasciola hepatica miracidia and the net rate of miracidial infections in Limnaea truncatula. Parasitology, 95: 159-163.
- SMITH, G. & CROMBIE, S.A. (1982). The rate of attachment of Fasciola hepatica miracidia to various species of lymnaeid. Journal of Parasitology, 68: 965-966.
- SMITH, G. & GRENFELL, B.T. (1984). The influence of water temperature and pH on the survival of Fasciola hepatica miracidia. Parasitology, 88: 97-104.
- SMITH, J.D. & HALTON, D.W. (1983). The Physiology of Trematodes. (2nd edition) Cambridge University Press., London. 446 pp.
- TAYLOR, E.L. (1949). The epidemiology of fascioliasis in Britain. XIV International Veterinary Congress, London: 81-87.
- TAYLOR, E.L. (1965). La fascioliasis y el distoma hepatico. FAO: Estudios Agropecuarios. Nº 64, Roma. pp. 249.
- TIELENS, A.G.M.; VAN DER MEER, P.; VAN DER BERGH, S.G. (1981). Fasciola hepatica: Simple, large-scale, "in vitro" excystment of metacercariae and subsequent isolation of juvenile liver flukes. Experimental Parasitology, 51: 8-12.
- URIARTE, J.; CABARET, J.; TANCO, J.A. (1985). The distribution and abundance of parasitic infections in sheep grazing on irrigated or non-irrigated pastures in north-eastern Spain. Annales Recherches Vétérinaire, 16: 321-325.

URQUHART, G.M.; DOYLE, J.; JENNINGS, F.W. (1970). Studies on ovine fascioliasis III. The comparative use of a molluscicide and antihelminthic in the control of the disease. *Veterinary Record*, 86: 338-345.

VAZQUEZ GOMEZ, M.A.; ALUNDA, J.M.; GOMEZ BAUTISTA, M.; ROJO VAZQUEZ, F.A. (1985). Biología de Fasciola hepatica. Efecto de algunos factores físicos sobre el desarrollo del huevo. *Medicina Veterinaria*, 2: 45-48.

WILSON, R.A. (1968). The hatching mechanism of the egg of Fasciola hepatica (L.). *Parasitology*, 58: 79-89.

WILSON, R.A. & TAYLOR, S.L. (1978). The effect of variations in host and parasite density on the level of parasitisation on Lymnaea truncatula by Fasciola hepatica. *Parasitology*, 76: 91-98.

WILSON, R.A. & DENISON, J. (1980). The parasitic castration and gigantism of Lymnaea truncatula infected with the larval stages of Fasciola hepatica. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61: 109-119.

WILSON, R.A. & DRASKAU, T. (1986). The stimulation of daughter rediae production during the larval development of Fasciola hepatica. *Parasitology*, 72: 245-257.

WRIGHT, P.S.; SWIRE, P.W. (1984). Soil type and the distribution of Lymnaea truncatula. *Veterinary Record*, 114: 294-295.