

DETERMINACION DE LA MEJOR COMBINACION DE ANIMAL DE LABORATORIO ESPECIE DE CARACOL-CARCA PARASITARIA-ORIGEN DE MIRACIDIO, PARA ESTUDIOS CON *Fasciola hepatica*.

ROSA MA. ANAYA Y DAVILA G. ²

OCTAVIO DE PAZ VILLAFAN ³

DOLORES MIRANDA HERNANDEZ ²

ANTONIA PEREZ PEREZ ²

RESUMEN

Se probó la infectividad de 8 cepas de metacercarias de *Fasciola hepatica* (que resultaron de infectar caracoles *Lymnaea cubensis*, *L. humilis*, *L. columella* y *L. bulimoides* con miracidios de *Fasciola hepatica* obtenidos de huevecillos de origen bovino y ovino) en conejos, cuyes, ratas ratones y hamsters a diferentes dosis, con el fin de determinar cuál es la mejor combinación de mamífero-especie de caracol-origen de huevecillo-carca parasitaria, para trabajos inmunológicos y quimioterapéuticos con *Fasciola hepatica*. Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones trabajadas 1) *Lymnaea columella* fue el caracol que produjo metacercarias más infectivas para todos los animales de laboratorio utilizados, 2) que debido a su sensibilidad a la infec-

ción, los ratones y los hamsters son los animales más recomendados para estudios inmunológicos, teniendo al cuye como alternativa y 3) que con los conejos y las ratas se obtienen infecciones relativamente constantes, por lo que serían buenos modelos para pruebas quimioterapéuticas.

INTRODUCCION

El uso de animales de laboratorio en estudios de *Fasciola hepatica* data de 1893 cuando Lutz infectó unos cuyes, un conejo, una rata café y una cabra con metacercarias enquistadas, iniciando de esta manera las infecciones experimentales de este parásito; el gran valor de este tipo de infecciones se extendió rápidamente por todo el mundo, y actualmente se cuenta con centenares de estudios realizados en ratón (Krull y Jackson, 1949; Dawes, 1961; Bruce et al., 1967, Lang, 1967; Harnes, Doy y Hughes, 1977), rata (Thorpe, 1965 a y b; Thorpe y Broome, 1962; Ray, 1969; Kariah y Howell, 1977; Hayes, Bailer y Mitrovic 1973), conejo (Montgomerie, 1931; Kerr y Petkovich, 1935; Urquhart, 1954 y 1956, Urquhart, Mulligan y Jennings

1 Trabajo parcialmente financiado por CONACyT, Proyecto PCABNA-005286.

2 Departamento Control de Vectores/Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Sector Pecuario/km15.5 Carretera México-Toluca, A.P. 652.

3 Departamento de Epizootiología/Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Sector Pecuario/km. 15.5 Carretera México-Toluca, A.P. 652.

1954; Kendall et al., 1967) cuye (Shirai, 1927; Shaw, 1932; Stoican y Lescinschi, 1959; Ross y O'Hagan, 1966) y hamster (Krull 1956; Lammler, 1959; Hyghes y Harnes, 1973; Ogunrinade, 1979). Los estudios realizados con estos animales han estado encaminados a pruebas inmunológicas, de infectividad, quimioterapia, patología y relaciones huésped-parásito, entre otras.

La mayoría de estos trabajos han sido realizados en Europa o Australia en donde sólo se cuenta con un hospedero intermediario de *Fasciola hepatica*, por lo que la infección se ha hecho con metacercarias obtenidas de ese hospedero; sin embargo, en los Estados Unidos de Norteamérica (Lang, 1977) y México (Landeros et al., 1981) se han señalado varios hospederos intermediarios en una misma zona; si se toman en cuenta los hallazgos de Kendall y Ollerenshaw (1963) y El Harith (1977) sobre la diferencia de infectividad de las metacercarias de *F. hepatica* dependiendo del caracol donde éstas se desarrollan, y los de Jansen y Over (1963), Presidente y Knapp (1972), Dalchow y Horhner (1972) y Knight (1978) sobre la influencia del origen del huevecillo en la infectividad de la metacercaria,

se llega a la conclusión de que en países con más de un hospedero intermediario se puede realizar una serie de combinaciones de especie de caracol, de origen de huevecillo, mamífero y número de metacercarias administradas, encaminadas a encontrar modelos de laboratorio para diferentes tipos de estudio, o bien para dilucidar cuál de todos los caracoles hospederos que se encuentren en una zona tiene más importancia en la transmisión del parásito.

En el presente trabajo se infectaron 5 especies de animales de laboratorio con varias cargas de metacercarias producidas por los diferentes caracoles hospederos de la República, infectados con miracidios de origen ovino y bovino a fin de encontrar las combinaciones útiles para posteriores trabajos principalmente quimioterapéuticos, inmunológicos o de ambas clases.

MATERIAL Y METODOS

Las metacercarias de *F. hepatica* se produjeron en el laboratorio al infectar caracoles *Lymnaea cubensis*, *L. humilis*, *L. bulimoides* y *L. columella* con miracidios de origen ovino y bovino y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

CUADRO I

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO

	O	B	Conejo				cuye				rata				hamster				ratón			
			50	30	20	0	15	10	5	0	15	10	5	0	15	10	5	0	5	2	1	0
<i>L. cubensis</i>																						
<i>L. humilis</i>																						
<i>L. columella</i>																						
<i>L. bulimoides</i>																						

Los ratones (NIH) de 20 a 30 g, las ratas (Wistar) de 120 g, los hamsters (Golden) de 40 a 50 g, los cuyes (Hartley) de 250 g, y los conejos (Nueva Zelanda) de 1.5 a 2.0 kg fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

Cada especie de animal de laboratorio fue infectada con 8 cepas de metacercarias (las que resultaron de infectar las 4 especies de caracoles con los 2 orígenes de huevecillo) a 3 dosis diferentes, dejando para cada especie de caracol un lote no infectado como testigo, ver Cuadro 1. Los conejos y los cuyes fueron infectados administrándoles, por vía oral, cápsulas de gelatina que contenían el número correcto de metacercarias, mientras que a los ratones, las ratas y los hamsters se les colocaron las metacercarias directamente en la lengua, con una espátula de metal.

De 10-15 días después de transcurrido el período prepatente* los conejos fueron sacrificados mediante un golpe en la nuca, y a los otros animales se les sacrificó intoxicándolos con cloroformo. Los hígados fueron separados y disectados para conocer el número de parásitos presentes en éste. A los animales que morían dentro del período prepatente se les practicaba la necropsia para buscar la posible causa de la muerte, además de examinar los hígados. Los hígados, una vez disectados se colocaban en solución salina fisiológica por un mínimo de una hora para asegurar la salida de todos los parásitos.

* Los períodos prepatentes son de 21 días para ratón, 40 para rata, 35 para cuye y 46 para conejo (comunicación personal del Dr. Froylán Ibarra); el del hamster no se conoce, pero se sacrificaron 40 días postinfección.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ratones

Basados en el número de animales que quedaron parasitados y en el número de fasciolas recuperadas en hígado (Cuadro 2) se puede ver que **L. columella** fue la especie de caracol que produjo metacercarias más infectivas, ya que se recuperaron 81 fasciolas de 50 animales positivos, siguiéndole **L. bulimoides** (29 de 19) y **L. cubensis** (17 de 10) siendo las de **L. humilis** las menos infectivas, sólo quedaron 6 animales positivos y con una fasciola cada uno.

En lo que se refiere al índice de mortalidad (número de animales muertos/número de animales infectados), es muy alto, y excepto para **L. bulimoides** parece no tener influencia la especie de caracol, pero sí la carga parasitaria. Es importante indicar que, a pesar de que algunos animales testigos murieron, al hacer la necropsia sólo se encontraron lesiones macroscópicas en pulmones y no en hígado, sucediendo lo mismo en el 20% de los animales infectados con cargas bajas de metacercarias, pero no así en los que recibieron 5 metacercarias, los cuales presentaron hígados severamente dañados; la mayoría de los animales con 5 metacercarias presentaban hemorragia en cavidad abdominal y en varios casos se encontró el hígado picado y fasciolas fuera de este órgano (pero adheridas a él).

La carga parasitaria presentó diferencia significativa, sin embargo, al calcular el índice de recuperación (número de fasciolas recuperadas/número total de metacercarias administradas) esta diferencia disminuye notablemente. En el Cuadro 3 se puede ver el análisis de varianza correspondiente a esta especie.

CUADRO 2

Resultados de la infección en ratones

	B O V I N O									O V I N O							
	No. de Metazoos carías	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Índice de parasitación	No. de animales muertos	Índice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Índice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Índice de parasitación	No. de animales muertos	Índice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Índice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal
<u>L. cubensis</u>	5	24	1	0.041	23	0.958	3	0.025	0.025	23	5	0.217	20	0.869	7	0.060	0.304
	2	24	1	0.041	16	0.750	1	0.020	0.042	23	2	0.087	17	0.739	5	0.108	0.212
	1	25	0	0.000	15	0.600	0	0.000	0.000	25	1	0.040	16	0.640	1	0.040	0.040
	0	25	0	0.000	9	0.360	0	0.000	0.000	--	-	-----	--	-----	-	-----	-----
<u>S. humilis</u>	5	25	1	0.40	20	0.800	1	0.008	0.040	20	0	0.000	16	0.800	0	0.000	0.000
	2	24	1	0.041	19	0.791	1	0.020	0.042	25	2	0.080	20	0.800	2	0.040	0.080
	1	24	0	0.000	18	0.750	0	0.000	0.000	25	2	0.080	18	0.720	2	0.080	0.080
	0	25	0	0.000	16	0.640	0	0.000	0.000	--	-	-----	--	-----	-	-----	-----
<u>L. colunella</u>	5	23	15	0.652	23	1.000	33	0.286	1.430	22	14	0.636	21	0.954	25	0.227	0.136
	2	25	9	0.360	15	0.600	11	0.220	0.440	23	4	0.173	10	0.434	4	0.086	0.174
	1	25	4	0.160	14	0.560	4	0.160	0.166	24	4	0.166	18	0.750	4	0.166	0.166
	0	24	0	0.000	4	0.000	0	0.000	0.000	--	--	-----	--	-----	-	-----	-----
<u>L. bulimoides</u>	5	23	4	0.173	13	0.565	10	0.100	0.550	21	8	0.380	14	0.666	10	0.095	0.476
	2	21	2	0.095	8	0.380	2	0.047	0.110	21	5	0.238	13	0.619	6	0.142	0.286
	1	22	1	0.045	11	0.500	1	0.045	0.055	23	0	0.000	11	0.478	0	0.000	0.000
	0	20	0	0.000	4	0.200	0	0.000	0.000	--	--	-----	--	-----	-	-----	-----

CUADRO 3
ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS DATOS DE RATON

Fuente	grados de libertad	Suma de cuadros	Cuadros medios	F
Especie	3	20.18	6.72	27.16*
Origen	1	0.01	0.01	0.04
Carga	3	22.93	7.64	30.87*
Especie x origen	3	1.75	0.58	2.34
Origen x carga	3	0.02	0.007	0.028
Especie x carga	9	24.31	2.7	10.91*
Esp. x origen x carga	9	1.47	0.163	0.659
Error	615	152.17	0.247	
Total	652			

* Significativo para $\alpha = 0.005$

Ratas

Como se puede ver en el Cuadro 4, las metacercarias producidas por las cuatro especies de caracoles trabajadas infectan en forma similar a las ratas ya que se recuperaron 37, 39, 30 y 31 fasciolas para *L. cubensis*, *L. humilis*, *L. columella* y *L. bulimoides* respectivamente, por lo que no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$).

En lo que se refiere al índice de mortalidad, es muy bajo, en el único caso que se puede considerar importante es en el de los animales infectados con 15 metacercarias de *L. cubensis* de origen bovino en el cual 4 de 9 animales murieron a causa de la infección. Los abscesos fueron el principal hallazgo en este caso.

La carga parasitaria presentó diferencia significativa ($P < 0.005$), y al calcular el índice de recuperación esta diferencia persistió, aunque no es en todos los casos la carga más alta la que tuvo el índice de recuperación más alto.

A pesar de que no se encontró diferencia significativa para especie, sí la hubo ($P < 0.005$) para la interacción especie x carga en donde se puede ver que de las metacercarias de *L. columella* administradas en dosis de 15 por animal fue de donde se recuperaron más parásitos.

En el Cuadro 5 se muestra el análisis de varianza para los resultados obtenidos con esta especie.

Hamsters

En los hamsters (Cuadro 6) al igual que en los ratones, las metacercarias producidas por *L. columella* fueron las más infectivas, pues se recuperaron 110 fasciolas mientras que con las de *L. cubensis* y con las de *L. humilis* solo fue posible recuperar 43 y 13, respectivamente. El número de animales que quedaron parasitados fue de 25, 16 y 8, respectivamente, por lo cual se encontró diferencia significativa ($P < 0.005$) para las especies (Cuadro 7). También se encontró diferencia significativa ($P < 0.005$) en el

CUADRO 4

Resultados de la infección en ratas

	BOVINO									OVINO							
	No. de Metacerarias	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Indice de parasitación	No. de animales muertos	Indice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Indice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Indice de parasitación	No. de animales muertos	Indice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Indice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal
<i>L. cubensis</i>	15	9	2	0.222	4	0.444	8	0.059	0.88	7	3	0.429	2	0.286	8	0.076	1.14
	10	9	3	0.333	4	0.444	9	0.100	1.00	5	2	0.222	1	0.111	3	0.033	0.33
	5	8	1	0.125	1	0.125	4	0.100	0.50	9	2	0.222	1	0.111	5	0.111	0.55
	0	9	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	--
<i>L. humilis</i>	15	5	5	1.000	0	0.000	9	0.120	1.80	5	2	0.400	0	0.000	6	0.080	1.20
	10	5	4	0.800	0	0.000	7	0.140	1.40	4	4	1.000	0	0.000	13	0.325	3.25
	5	5	2	0.400	0	0.000	3	0.120	0.60	5	1	0.200	0	0.000	1	0.040	0.20
	0	5	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	--
<i>L. columella</i>	15	5	5	1.000	0	0.000	16	0.213	3.20	5	5	1.000	0	0.000	7	0.093	1.40
	10	3	1	0.333	0	0.000	2	0.066	0.66	5	2	0.400	0	0.000	2	0.040	0.40
	5	5	1	0.200	1	0.200	2	0.080	0.40	5	1	0.200	1	0.200	1	0.040	0.20
	0	5	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	--
<i>L. bulbimoides</i>	15	4	2	0.500	1	0.250	2	0.033	0.50	3	2	0.666	0	0.000	7	0.155	2.33
	10	4	3	0.750	0	0.000	12	0.300	3.00	4	1	0.250	1	0.250	1	0.025	0.25
	5	4	0	0.000	2	0.500	0	0.000	0.00	4	3	0.750	1	0.250	9	0.450	2.25
	0	3	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	--

CUADRO 5

Análisis de varianza para los datos de rata

Fuente	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadros medios	F
Especie	3	9.116	3.039	2.358
Origen	1	0.67	0.67	0.520
Carga	3	39.358	13.119	10.182*
Especie x origen	3	3.552	1.184	0.919
Especie x carga	9	24.787	2.754	2.317
Origen x carga	3	3.84	1.28	0.993
Especie x origen x carga	9	106.47	11.829	9.180*
Error	121	155.91	1.289	
Total	152	304.33		

* Significativo para $\alpha = 0.005$

origen de huevecillo, pues se recuperaron 96 fasciolas de la metacercaria de origen bovino y 70 de las de origen ovino. Sin embargo, respecto a la interacción de estos dos parámetros sólo se encontró diferencia a $\alpha = 0.05$. En lo que se refiere a carga parasitaria se encontró diferencia significativa ($P < 0.005$), pero curiosamente no fueron las cargas más altas a las que correspondió mayor número de parásitos.

La mortalidad encontrada en esta especie fue elevada, murieron 70 de 146 animales infectados (48%), pero de estos sólo en 49 se recuperaron parásitos; sin embargo, la mayoría de los animales infectados con 10 y 15 metacercarias de *L. humilis* murieron a pesar de no haberles encontrado parásitos en hígado. La mayoría de las muertes de estos animales sucedieron entre los días 26 y 39 postinfección.

Debido a que los hamsters morían dentro del período prepatente con hemorragia en cavidad abdominal y el hígado se encontró severamente dañado, se decidió no seguir los trabajos con esta especie ya que no podría llegar a ser un buen modelo de laboratorio, razón por la cual sólo se trabajó con metacercarias de tres especies de caracol y menor número de animales.

La alta susceptibilidad del hamster a *F. hepatica*, encontrada en este trabajo, coincide con lo que informó Lammler en 1968.

Cuyes

Al igual que en ratones y hamsters, las metacercarias *L. columella* fueron las que más infectaron, ya que se encontraron 63 parásitos, mientras que con *L. bulimoides*, 42; 23 con *L. cubensis* y 22 con *L. humilis*, siendo

CUADRO 6

Resultados de la infección en hamsters

	B O V I N O									O V I N O							
	No. de Metacer carias	No. de animales infectador	No. de animales parasitados	Indice de parasitación	No. de animales muertos	Indice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Indice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Indice de parasitación	No. de animales muertos	Indice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Indice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal
<i>L. cubensis</i>	15	6 ⁽¹⁰⁾	2	0.333	2 ⁽⁶⁾	0.333	4	0.044	0.67	7 ⁽¹⁰⁾	2	0.285	5 ⁽⁸⁾	0.714	6	0.008	0.86
	10	8 ⁽⁹⁾	4	0.500	6 ⁽⁷⁾	0.750	17	0.175	2.13	9 ⁽¹⁰⁾	2	0.222	7 (8)	0.777	4	0.044	0.44
	5	9	5	1.000	4	0.800	11	0.244	1.22	9 ⁽¹⁰⁾	1	0.111	4 (5)	0.449	1	0.022	0.11
	0	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	--	-	--	--	--	--	--	--
<i>L. humilis</i>	15	5	0	0.000	4	0.800	0	0.000	0.00	5	0	0.000	5	1.000	0	0.000	0.00
	10	5	2	0.400	3	0.600	3	0.060	0.60	5	1	0.200	4	0.800	1	0.020	0.20
	5	5	3	0.600	1		7	0.280	1.40	5	2	0.400	3	0.600	2	0.080	0.40
	0	4	0	0.000	0	0.000	0		0.00	-	-	--	-	--	-	--	--
<i>L. columella</i>	15	5	5	1.000	5	1.000	21	0.280	4.20	5	4	0.800	5	1.000	16	0.213	4.00
	10	5	2	0.400	3	0.600	15	0.300	3.00	5	5	1.000	3	0.600	29	0.580	5.00
	5	5	5	1.000	3	0.600	18	0.720	3.60	5	4	0.800	3	0.600	11	0.440	2.75
	0	5	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	--	--	--

* Las cifras entre paréntesis indican los animales infectados, las de fuera los animales con los que se efectuaron los cálculos; las diferencias entre ambos valores corresponden a animales cuyos hígados e intestinos se encontraban pastosos por el daño producido por la infección, y no fue posible determinar si había parásitos.

CUADRO 7

Análisis de varianza para los datos de hamsters

Fuente	grados de libertad	Suma de cuadros	Cuadros medios	F
Especie	2	159.84	79.92	158.59*
Origen	1	5.52	5.52	10.95*
Carga	3	45.70	15.23	30.22*
Especie x origen	2	4.49	2.245	4.45**
Especie x carga	6	35.87	5.98	11.87*
Carga x origen	3	7.62	2.54	5.04*
Esp.x carga x origen	6	28.31	4.72	9.36*
Error	104	52.41	0.504	
Total	127	549.88		

* Significativo para $\alpha = 0.005$

** Significativo para $\alpha = 0.05$

éstos, al igual que en los otros mamíferos excepto ratas, las metacercarias menos infectivas, aunque en este caso no haya habido diferencia significativa entre *L. cubensis* y *L. humilis* (Cuadro 8).

El número de animales que quedaron parasitados fue de 11, 16, 29 y 21 en *L. cubensis*, *L. humilis*, *L. columella* y *L. bulimoides*, respectivamente.

Se recuperaron más parásitos cuando se administraron 10 metacercarias, y se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) en cuanto a la carga, pues de 10 metacercarias se recuperaron más parásitos.

En cuanto a la diferencia significativa ($P < 0.005$) encontrada en la interacción de especie y origen, se puede ver que excepto el caso de *L. bulimoides* las metacercarias de origen bovino fueron más infectivas que las de origen ovino.

En el Cuadro 9 puede verse el análisis de varianza correspondiente a esta especie.

Conejos

El total de fasciolas recuperadas en las diferentes especies de caracol (Cuadro 10) fue de 302, 120, 543 y 207 en *L. cubensis*, *L. humilis*, *L. columella* y *L. bulimoides*, respectivamente, encontrándose diferencia significativa ($P < 0.005$) para especie, por lo que como se puede ver, las metacercarias producidas por *L. columella* fueron las más infectivas seguidas por las de *L. cubensis* y *L. bulimoides*, siendo las de *L. humilis* las menos infectivas. Sin embargo, salvo el caso de *L. humilis* en donde sólo el 6.06% de las metacercarias administradas llegaron a la madurez, el porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango que encontró Boray en 1963.

En lo que se refiere al origen del huevecillo, se encontró diferencia significativa ($P < 0.005$); los de origen ovino infectaron más que los de origen bovino ya que del primero se recuperaron 650 fasciolas, mientras que del segundo sólo 516.

CUADRO 8

Resultados de la infección en cuyes

	BOVINO									OVINO							
	No. de Mezclas	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Índice de parasitación	No. de animales muertos	Índice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Índice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Índice de parasitación	No. de animales muertos	Índice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Índice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal
L. squarrosus	15	6	3	0.500	3	0.500	7	0.077	1.17	9	1	0.111	2	0.222	1	0.007	0.11
	10	7	2	0.286	6	0.857	5	0.071	0.71	7	3	0.429	2	0.286	8	0.114	1.14
	5	7	2	0.286	1	0.143	2	0.057	0.29	8	0	0.000	3	0.375	0	0.000	0.00
	0	8	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	-
L. trilineatus	15	9	4	0.444	0	0.000	4	0.029	0.44	9	2	0.222	3	0.333	2	0.014	0.22
	10	10	4	0.400	2	0.200	7	0.070	0.70	10	4	0.400	3	0.300	7	0.070	0.70
	5	10	2	0.200	2	0.200	2	0.040	0.20	10	0	0.000	1	0.100	0	0.000	0.00
	0	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	-
L. colubriformis	15	10	7	0.700	6	0.600	25	0.167	2.50	10	4	0.400	4	0.400	6	0.040	0.60
	10	10	7	0.700	1	0.100	13	0.130	1.30	10	3	0.300	1	0.100	4	0.040	0.40
	5	10	5	0.500	0	0.000	6	0.120	0.60	10	3	0.300	5	0.500	4	0.080	0.40
	0	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	-
L. sparsum	15	10	4	0.400	0	0.000	7	0.046	0.70	10	5	0.500	1	0.500	17	0.113	1.7
	10	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	10	5	0.500	0	0.000	11	0.110	1.1
	5	10	2	0.200	0	0.000	2	0.040	0.20	10	5	0.500	1	0.100	5	0.100	0.5
	0	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	-	-	--	-	--	-	--	-

CUADRO 9

Análisis de varianza para los datos de cuye

FUENTE	grados de libertad	Suma de Cuadros	Cuadros medios	F
Especie	3	12.65	4.217	3.637**
Origen	1	1.91	1.91	1.647
Carga	3	33.21	11.07	9.549*
Especie x origen	3	24.94	8.31	7.168*
Origen x carga	3	3.63	1.21	1.044
Especie x carga	9	10.80	1.2	1.035
Especie x origen x carga	9	12.01	1.334	1.15
Error	228	264.31	1.159	
Total	259	363.46		

* Significativo para $\alpha = 0.005$.** Significativo para $\alpha = 0.025$

Aunque hubo diferencia significativa ($P < 0.005$) para carga parasitaria, al relacionar el número de fasciolas recuperadas con el número de metacercarias administradas a través del índice de recuperación esta diferencia desaparece (Cuadro 10).

El análisis de varianza de los datos encontrados en conejos consta en el Cuadro 11.

Las lesiones más comunes en los hígados de estos animales fueron fibrosis y abscesos (en algunos de los cuales llegaron a encontrar fasciolas encapsuladas o huevecillos del parásito); pero no se encontró tanto daño como en las otras especies. Hubo muy poca mortalidad (1.7%), tal vez debido a que son hospederos reservorios naturales (Borchert, 1975; Thomas, 1982; Olsen, 1948).

En forma general, las metacercarias de *L. columella* fueron las más infectivas en las 5 especies de mamíferos trabajados, y las de *L. humilis* fueron las menos infectivas. En el caso de ratón y hamster, tal vez esto se haya debido al tamaño que desarrollaron, ya que en ratón las fasciolas adultas de *L. columella* más grandes que se encontraron, midieron 0.6 cm, generalmente se localizaron en los conductos biliares del hígado, mientras que las de *L. cubensis* y *L. humilis* midieron de 1.3 a 1.6 cm y se encontraron en la mayoría de los casos en el conducto colédoco, obstruyéndolo total o casi totalmente; las fasciolas de *L. bulimoides* midieron de 0.8 a 1.2 cm; en el caso de los hamsters, las fasciolas de *L. columella* midieron de 0.5 a 1.0 cm, mientras

CUADRO 10

Resultados de la infección en conejos

	B O V I N O									O V I N O							
	No. de Metacerarias	No. de animales infectados	No. de animales parasitados	Indice de parasitación	No. de animales muertos	Indice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Indice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal	No. de animales infectados	No. de animales rasitados	Indice de parasitación	No. de animales muertos	Indice de mortalidad	No. de Fasciolas recuperadas	Indice de recuperación	Promedio de Fasciolas por animal
<i>L. cubensis</i>	50	15	12	0.800	1	0.266	80	0.106	5.33	15	10	0.666	2	0.133	83	0.166	5.53
	30	15	10	0.666	0	0.000	31	0.680	2.07	14	9	0.643	0	0.000	45	0.107	3.21
	20	14	4	0.286	1	0.071	15	0.053	1.07	15	11	0.733	0	0.000	48	0.160	3.20
	0	15	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	--	--	--	-	--	--	--	--
<i>L. humilis</i>	50	10	9	0.900	0	0.000	34	0.068	3.40	10	5	0.500	0	0.000	37	0.074	3.7
	30	10	5	0.500	0	0.000	14	0.047	1.40	10	6	0.600	0	0.000	12	0.040	1.2
	20	9	5	0.555	0	0.000	14	0.077	1.56	10	3	0.300	0	0.000	9	0.045	0.9
	0	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	--	-	--	-	--	--	--	-
<i>L. columella</i>	50	10	10	1.000	0	0.000	141	0.282	14.10	10	7	0.700	0	0.000	153	0.306	15.30
	30	10	8	0.800	0	0.000	82	0.273	8.20	10	10	1.000	0	0.000	71	0.237	7.10
	20	10	10	1.000	0	0.000	46	0.230	4.60	10	10	1.000	0	0.000	50	0.250	5.00
	0	10	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	--	--	--	-	--	--	--	-
<i>L. bulimoides</i>	50	8	5	0.625	0	0.000	27	0.067	3.37	8	8	1.000	0	0.000	96	0.240	12.00
	30	8	6	0.750	0	0.000	21	0.088	2.63	8	6	0.750	1	0.125	22	0.092	2.75
	20	8	4	0.500	0	0.000	15	0.093	1.87	8	6	0.750	0	0.000	26	0.165	3.25
	0	8	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.00	--	--	--	-	--	--	--	-

CUADRO 11
Análisis de varianza para los resultados de conejos

Fuente	grados de libertad	Suma de Cuadros	Cuadros medios	F
Especie	3	1460.25	486.75	106.74*
Origen	1	52.14	52.14	11.43*
Carqa	3	1961.47	653.82	143.38*
Especie x origen	3	108.94	36.31	7.96*
Origen x carga	3	58.05	19.35	4.24**
Especie x carqa	9	633.06	70.34	15.43*
Esp.x origen x carga	9	148.59	16.51	3.62*
Error	265	1210.24	4.56	
Total	296	10210.37		

* Significativo para $\alpha = 0.005$

** Significativo para $\alpha = 0.01$

que los parásitos de las otras especies siempre midieron más de 1.0 cm, llegando a medir hasta 1.8 cm. Existe diferencia en el índice de recuperación encontrado en este trabajo con relación a otros; tal vez se deba precisamente a esa diferencia de tamaño ya que autores como Boray (1963) comunican que el tamaño normal de *F. hepatica* en ratón 3 semanas después de la infección es de 2.6 a 3 mm mientras que con *L. cubensis* a los 21 días (aproximadamente 3 semanas) las fasciolas encontradas en este trabajo median más de 1.0 cm. En las otras especies de mamífero el tamaño de las fasciolas recuperadas fue semejante en las 8 cepas de metacercarias, por lo cual tal vez el tamaño de la fasciola no es el parámetro más importante, aunque no se puede despreciar su influencia.

Otra posible causa de diferencia en el número de parásitos encontrados en este trabajo con respecto a otros, podría ser el diferente cuidado en la

manipulación de los quistes para la infección o en la recuperación de los parásitos del hígado, como mencionan Dawes y Huges (1964).

Los hamsters y los ratones presentaron grandes zonas del hígado con daños severos que provocaron la muerte de los animales dentro del período prepatente, lo que coincide con Lammler (1959). Dawes y Huges (1964) en un trabajo recapitulativo presentan detalladamente los daños producidos por *Fasciola hepatica* en ratones a diferentes edades del parásito, pero obtienen un alto índice de mortalidad; los resultados de este trabajo coinciden con los de estos autores.

Lammler (1955 y 1959) encuentra en cuye, al igual que en hamster y ratón, que los daños producidos por el parásito son tan severos que causan la muerte de los animales dentro del período prepatente. Asimismo Boray (1969) obtuvo cerca del 50% de mortalidad al administrar 10

metacercarias (a cuyes) mientras que en este trabajo sólo el 20% de los animales infectados con 10 metacercarias murieron y el 18% (21% sin incluir los testigos) del total de animales infectados; la muerte se presentó en la mayoría de los casos a partir de los últimos días del período prepatente; los animales presentaban hemorragia en cavidad abdominal (y en algunos casos en cavidad torácica) hepatomegalia y grandes zonas verdes además de abscesos en algunos de ellos. Por otra parte, sólo 77 de 260 (el 29% del total y 34% de los testigos) quedaron positivos y en el 50% de ellos se encontró hepatomegalia y grandes zonas verdes que muchas veces cubrían lóbulos completos, lo que coincide con Schumancher (1956) quien informa que el cuye es un hospedero experimental pobre debido a que el hígado queda seriamente dañado. Wagner (1929) menciona severos cambios patológicos en hígado, debidos principalmente a infecciones bacterianas secundarias, con la consecuente alta mortalidad, sin embargo, Tewari (1969) administró un antibiótico de amplio espectro sin que se redujera la mortalidad y vacunó contra *Clostridium oedematiens* sin encontrar protección. Es importante señalar que las metacercarias utilizadas en estos trabajos se obtuvieron de diferentes especies de caracol, pudiéndose deber a esto los distintos resultados encontrados. Por otra parte Tewari (1969) informa que el número de fasciolas recuperadas disminuye notablemente conforme avanza la infección, tal vez ésta sea otra causa de la baja recuperación de parásitos en esta especie.

En los conejos los daños que más comúnmente se encontraron en este trabajo fueron fibrosis, lo que coincide con lo descrito por Boray en 1963. Los conejos y las ratas fueron, en general, los animales que presentaron

menos daños hepáticos; en algunos casos, a nivel macroscópico, el hígado tenía apariencia normal.

A pesar de que no se pueden comparar entre sí las diferentes especies de mamíferos infectados en este trabajo debido a que sus hábitos alimenticios, el número de metacercarias administradas y la forma de administración fueron diferentes, es posible hacer algunos comentarios generales:

Los ratones y los hamsters, al ser tan susceptibles y morir a causa de la infección con *Fasciola hepatica*, son las especies más recomendadas para trabajos inmunológicos, ya que el hecho de que disminuyera la mortalidad sería un indicio de la efectividad del producto inmunogénico sometido a prueba. Esto, sin embargo, no implica que las otras especies quedarán excluidas de este tipo de trabajos, es más, hay informes de que la rata sirve como modelo inmunológico para el bovino, mientras que el ratón lo es para el ovino (Armour y Dargie 1974; Boray 1969) y de que el conejo sirve no sólo para pruebas quimioterapéuticas y patológicas sino también inmunológicas.

Los cuyes, a pesar de que presentan baja infectividad (en cuanto al número de fasciolas recuperadas) sufren severos daños en hígado, lo que no ocurre con los animales testigo. Aunque algunos autores como Wagner (1929) y Lammler (1955) dicen que los cambios patológicos se deben a infecciones bacterianas secundarias, estos daños están asociados a la presencia o al paso de fasciola por el hígado, por lo que el cuye pudiera ser una alternativa para estudios inmunológicos. Por otra parte esta especie, al igual que el ratón y la rata, ha sido ampliamente utilizada en el laboratorio McMaster para pruebas de viabilidad de metacercarias (Boray 1963).

Con los conejos y las ratas se obtuvo una buena recuperación de parásitos por lo que podría preferirseles para pruebas de rastreo de compuestos con actividad biológica contra *Fasciola hepatica*. Aunque hasta ahora no se han realizado este tipo de estudios en este laboratorio es importante señalar que, debido a que existen trabajos previos en este campo, con ratas hay algunos datos que sería importante tomar en cuenta como son: 1) la edad de la rata afecta la infección, infecciones con 5-10 metacercarias fallaron en ratas de 5-6 meses de edad, 2) los parásitos que mueren (en rata) son encapsulados en tejido conectivo antes de la maduración sexual, 3) algunos parásitos dilatan los conductos biliares principales y producen huevecillos por 6-7 meses, pero la mayoría de las ratas pierden sus parásitos cuatro meses después de la infección o mueren debido a los cambios patológicos crónicos (Boray 1963). Por otra parte Lammler (1959) encontró que en las ratas los gusanos fueron más susceptibles a los antihelmínticos que en los conejos.

Todas las especies de mamífero de laboratorio pueden ser infectadas con metacercarias de *L. columella*, obteniendo buenas infecciones; en cuanto a la carga de metacercarias que se utilizará todo dependería del tipo de respuesta que se busque en cada trabajo.

A pesar de que los resultados obtenidos en este estudio aportan mucha información sobre cómo se podrían hacer infecciones experimentales para diferentes tipos de trabajo, es necesario continuar trabajando al respecto, para evaluar parámetros no contemplados aquí.

Los autores de este trabajo agradecen al señor Alvaro Herrera Mendoza su ayuda en el mantenimiento y manejo de los animales y al Dr. Esteban Labradero Iñigo el haber proporcionado los animales en las fechas requeridas.

SUMMARY

Eight kinds of *Fasciola hepatica* metacercariae (those obtained of infected *Lymnaea cubensis*, *L. humilis*, *L. columella* and *L. bulimoides* snails with ovine and *Fasciola hepatica* miracidium) were tested in rats, rabbits, mice, hamsters and guinea pigs at different doses, to determine the best combination laboratory mammal-snail specie-egg origin-parasitic dose for immunologic and chemotherapeutic studies with *Fasciola hepatica*.

The results obtained in these study conditions show: 1) the metacercariae obtained with *L. columella* were the most infective for the mammals infected, 2) mice and hamsters are the most susceptible mammals and are the best species for immunological studies; guinea pigs are an alternative specie and 3) rabbits and rats are recommended for chemotherapeutical studies.

LITERATURA CITADA

ARMOUR, J. and Dargle J. D., 1974. Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Exp. Parasit.* 35:381-388.

BORAY, J. C., 1963. Standardization of techniques for pathological and anthelmintic studies with *Fasciola spp.* Proc. 1st. Int. Conf. Wild. Ass. Advm. *Vet. Parasit.* Hanover 1963, 34-45.

BORAY J. C., 1969. Experimental Fasciolosis in Australia, *Adv. Parasit.* 7:95-210.

BORCHERT A., 1975. Parasitología Veterinaria, Ed. Acribia, España.

BRUCE, Z.L., LARCH, J.E., WEATHERLY, N.F. and GOULSON, H.T., 1967. Demonstration of immunity to *Fasciola hepatica* in recipient mice given peritoneal exudate cells. *J. Parasitol.* 53(1):208-209.

DALCHOW, W. and HORCHNER, F., 1972. Experimental *Fasciola hepatica* infection in various animal species *Berliner und muchener tierar Woch.* 85 (4): 271-274 (tomado del *Biological Abstracts* 1973).

- DAWES B., 1961. Juvenile stages of *Fasciola hepatica* in the liver of the mouse **Nature**, Lond., 190: 646-647.
- DAWES B. and HUGHES D.L., 1964. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. **Adv. Parasit.** 2:97-168.
- EL-HARITH A., 1977. Observations on the influence of the intermediate host in experimental fascioliasis. Tesis Doctoral de la Universidad de Holanda (tomado del **Biological Abstracts**, 1977).
- HARNES E., DAY T.G. and HUGHES D.L. 1977. The early migratory behaviour of young *Fasciola hepatica* in sensitized mice. **Intern. J. Parasit.** 7:51-54.
- HAYES T.J., BAILER J. and MITROVIC M., 1973. The pattern of mortality in mice experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Intern Parasit.** 3:665-669.
- HYGHES, D.L. and HARNES E., 1973. The experimental transfer of immature *Fasciola hepatica* from donor mice and hamsters to rats immunised against the donors, **Res. Vet. Sci.** 14:220-222.
- JANSEN J. and OVER, H.J., 1963. On a remarkable strain of *Fasciola hepatica* in the Netherlands Tijdschr Diergeneesk 88:775-779 (tomado del **Biological Abstracts** 1964).
- KARIAH R. and HOWELL, M.J., 1977. *Fasciola hepatica* in rats: effects of age and infective dose **Intern J. Parasitol**, 7:119-121.
- KENDALL, S.B. and OLLERENSHAW; C.B., 1963. The effect of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. **Proc. Nat. Soc.** 22:41-46.
- KENDALL, S.B., HERBERT, N., PARFITT, J.W. and PEIRCE, M.A., 1967. Resistance to reinfection with *Fasciola hepatica* in rabbits. **Expl. Parasit.** 20:242-247.
- KERR K.B and PETROKUICH O. L. 1935. Active immunity in rabbits to the liver fluke *Fasciola hepatica*. **J. Parasit** 21, 319-320 (citado por Pantelouris E.M. en The common liver fluke, **Intern series monographs on pure and applied biology** pergamon Press. 1965).
- KNIGHT, R. A., 1978. Experimental cross infections of *Fasciola hepatica* in lambs and calves **J. Parasitol** 64(4):601-605.
- KRULL, W. H., 1956. **Cornell Vet.** 45:511-525 (citado por Dawes B. and Hughes D.L., 1964) Fascioliasis the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts, **Adv. Parasit.** 2:97-168.
- KRULL W.H. and JACKSON, R.S., 1943. Observations on the route of migration of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*. In the definitive host, **J. Wash Acad. Sci.** 33: 79-82 (citado por Pantelouris E. M. en The common liver fluke, **Intern series monographs on pure and applied biology**. Per amon Press 1965).
- LAMMLER, G., 1955. Die Chemotherapie der Fasciolose. **Arzneimittelforsch** 5:497-502 (citado por Boray J. C., 1963, Standardization of Techniques for pathological and anthelmintic studies with *Fasciola* spp. **Proc. 1. Int. Conf. Wid. Ass. Advmt. vet Parasit.** Hanover, 1963. 34-45.
- LAMMLER, G., 1959 Die Chemotherapie der Fasciolose III Mitteilung Uber dre experimentelle *Fasciola hepatica*. Infektion der Albino Ratte **Z Tropenmed Parasit.** 10:379-384 (citada por Boray).
- J.C., 1963. Standardization of Techniques for pathological and anthelmintic studies with *Fasciola* spp. **Proc. 1 Int. Conf Wid. Ass Advmt. Vet. Parasit.** Hanover 1963, 34-45).
- LAMMLER G. 1968. Chemotherapy of trematode infections, **Adv. Chemother.** 3:153-251.
- LANDEROS M.A., IBARRA V.F., ESCUDERO C.J. y MILIAN S.F., 1981. Determinación de algunos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en la cuenca lechera de Tulancingo, **Hgo. Téc. Pec. Méx.** 40:47-51.
- LANG, B.Z., 1967. Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in white mouse II studies on acquired immunity, **J. Parasit.** 53:21-30.
- LANG, B., 1977. Snail and mammalian hosts for *Fasciola hepatica* in eastern Washington, **J. Parasit.** 63 (5):938-939.
- LUTZ, A, 1983. **Zbl. W. Bakt** 13, 320-328 (citado por Dawes B. and Hughes D.L., 1964, en Fascioliasis: The invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts, **Adv. Parasit.** 2:97-168).
- MONTGOMERIE R.F., 1931. **J. Helminth.** 9:209-212 (citado por Dawes B. and Hughes D.L., 1964, en Fascioliasis: The invasive stages of

- Fasciola hepatica** in mammalian host **Adv. Parasit** 2:97-168).
- OGUNRINADE, A., 1979. Assessment of the attenuation produced by irradiation of **Fasciola gigantica** metacercariae in hamsters. **Res. Vet. Sci.** 27:238-239.
- OLSEN, O. W., 1948. Wild rabbits as reservoir hosts of the common liver fluke **Fasciola hepatica** in southern Texas. **J. Parasit.** 34:119-123.
- RAY, R.J., 1969. The effect of simultaneous treatment with hexachlorephene and Nitroxylin upon **Fasciola hepatica** in rats and rabbits **Res. Vet. Sci.** 10:405-408.
- ROSS, J.G. and O'HAGAN J. 1966. A biological technique to assess numbers of **Fasciola hepatica** metacercariae on pastures. **J. Helminth** 40:375-378.
- SCHUMALIER, W., 1956. **Z. Parasitenk** 17:276-281 (citado por Dawes B. and Hughes D.L., 1964, en Fascioliasis: The invasive stages of **Fasciola hepatica** in mammalian hosts. **Adv. Parasit.** 2:97-168).
- SHAW, J.N., 1932. **J. Amer. Vet. Assoc. N.S.** 34:76-82 (citado por Dawes B. and Hughes D.L. 1964, en Fascioliasis: The invasive stages of **Fasciola hepatica** in mammalian hosts. **Adv. Parasit.** 2:97-168).
- SHIRAI, M., 1927. **Sci. Rep. Gov. Inst. Int. Dis. Tokyo** 6:511-523 (citado por Dawes B. and Hughes D.L., 1964, en Fascioliasis: The invasive stages of **Fasciola hepatica** in mammalian hosts, **Adv. Parasit**, 2:97-168).
- STOCAIN, E. and LESCINSCHI, S. 1959. Probleme de Parasitologie Veterinaria **Institutul de Patologie si Igiene Animala, Bucharest** No. 6, 60-65 (citado por Mango A.M., Mango C.K.A. and Esamal D. en A preliminary note on the susceptibility, prepatency and recovery of **Fasciola gigantica** in small laboratory animals, **J. Helminthol.** 46:381-386).
- TEWARY H.C., 1969. Studies on experimental **Fasciola hepatica** infections in the guinea pig. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 62:495-501.
- THOMAS, A.P., 1982. The rot in sheep or the life history of the liver fluke **Nature** 26:606-608 (citado por Pantelouris E.M. en The common liver fluke, **Intern series monographs on pure and applied biology** pergamon Press 1965).
- THORPE, E. 1965a. The pathology of experimental fascioliasis in the albino rat **J. Comp. Path** 75:39-44.
- THORPE E. 1965b. Chemotherapy of experimental fascioliasis in the albino rat **J. Comp. Path.** 75: 45-53.
- THORPE E. and BROOME A. W.J., 1962. Immunity to **Fasciola hepatica** infection in albino rats vaccinated with irradiated metacercariae. **Vet. Rec.** 74:755-756.
- URQUHART, G. M. 1954. The rabbit as host in experimental fascioliasis. **Expl. Parasit.** 3:38-44 (citado por Mango y Mango, Dawes y Pantelouris).
- URQUHART, G., M. 1958. The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit, **J. Path Bact.** 71:301-310 (citado por Mango A.M., Mango C.K.A. and Esamal D. en A preliminary note on the susceptibility, prepatency and recovery of **Fasciola gigantica**).
- URQUHART, G. M., MULLIGAN, Q. and JENNINGS F.W., 1954. Artificial immunity to **Fasciola hepatica** in rabbits **J. Infect. Dis.** 94:126-133 (citado por Mango A.M., Mango C.K. A. and Esamal D. en A preliminary note on the susceptibility, prepatency and recovery of **Fasciola gigantica** in small laboratory animals, **J. Helminthol.** 44(4):381-386).
- WAGNER O., 1929. Experimentelle Untersuchungen uber die Biologie des gemeinen Leberegels und seine ubertragung auf kleine Laboratoriumsteire **Munch. Tierarztl. Wochenschr** 80:28-29 (citado por Boray J. C. 1963, Standardization of Technique for pathological and anthelmintic studies with **Fasciola** spp **Proc. 1. Conf. Wild Ass. Advmt. Vet. Parasit.**, Hanover 1963, 34-45).