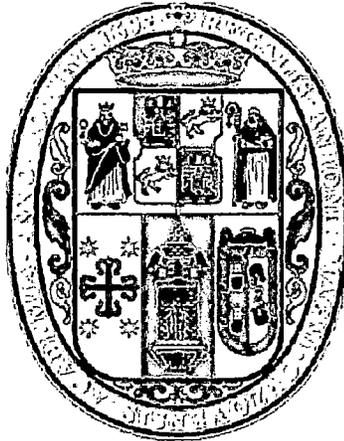


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Estudio experimental del ciclo biológico de *Fasciola hepatica* y eficacia de su controlador natural *Chaetogaster limnaei* en laboratorio

Tesis presentada por:

Bach. Paul Adrian Iturbe Espinoza

Para optar al Título Profesional de Biólogo

Asesora:

Master Flavia Carroll Muñiz Pareja

CUSCO – PERÚ

2012

AGRADECIMIENTOS

A mi familia (Mi mamá Dina, mis hermanos Carlos, Dina, John y mi sobrina Jade) por ser mi soporte y por su apoyo en esta investigación.

A la Master Flavia Muñiz Pareja, por contagiarme su pasión por la Parasitología, por dejarme trabajar con total libertad, por confiar en mí para este trabajo, por enseñarme a razonar, a cuestionar, a entender, por transmitirme sus conocimientos, por dedicarle horas, días, meses y años a resolver cuestiones inherentes a este trabajo, por su paciencia, por sus ganas de enseñarme, y por asesorarme.

A Grace y Jorge por ser los mejores amigos que tengo, por su aliento, incondicionalidad y consejos acertados.

A los compañeros del bioterio (Vladimir, Saúl, , Melania y Alejandro) por estar en forma incondicional atendiendo a las ratitas, por ocuparse de todos los detalles para su cuidado, por abrirme las puertas de bioterio, y estar siempre con la mejor predisposición.

A mis amigos de la Facultad: Aleli, Karen, Katy, Mayday, Melania, Paola, Rosy, Zarela, Anthony, Edgar, John y Roberto por su grata amistad y por ayudarme en el campo y en el laboratorio.

A mis amigos de Tinta César, Edgard, Humberto, John, Jons, Piero, y Willy por apoyarme, por su complicidad y aprecio.

¡A todos GRACIAS!

DEDICATORIA

Con todo mi amor y gratitud a mi madre por el sustento y voluntad que me ofrece constantemente y para la ejecución del presente estudio.

Índice

Página

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
JUSTIFICACIÓN	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO	14
1.1 Antecedentes Internacionales.....	14
1.2 Antecedentes Nacionales y Locales.....	21
1.3 <i>Fasciola hepatica</i>	23
1.3.1 Historia del descubrimiento del ciclo de <i>F. hepatica</i>	23
1.3.2 Posición Taxonómica de <i>Fasciola hepatica</i>	24
1.3.3 Caracterización morfológica.....	24
1.3.4 Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	26
1.3.4.1 Salida de los huevos desde el hospedero definitivo al medio y su desarrollo embrionario.....	27
1.3.4.2 Ruptura de los huevos y salida del miracidio	28
1.3.4.3 Desarrollo y multiplicación dentro del hospedero intermediario.	29
1.3.4.4 Emisión de cercarias y formación de metacercarias.....	30
1.3.4.5 Ingestión del estadio infectivo y desarrollo hasta el estadio adulto.....	32
1.4 Limneidos	33
1.4.1 Descripción	33
1.4.2 Posición taxonómica	33
1.4.3 Morfología externa	34
1.4.4 Morfología interna.....	35
1.4.5 Efectos patógenos de las larvas de <i>F. hepatica</i> en el caracol.....	37
1.4.6 Factores ambientales que afectan la transmisión de <i>F. hepatica</i> en hospedadores intermediarios.....	38
1.5 <i>Rattus norvegicus albus</i> Berkenhout, 1769.....	38
1.5.1 Descripción	38
1.5.2 Posición taxonómica	40

1.5.3 Bioterio de <i>R. norvegicus</i>	40
1.5.4 Principios éticos básicos en la experimentación animal como reactivo biológico	41
1.6 <i>Chaetogaster limnaei</i>	42
1.6.1 Posición taxonómica	44
1.7 Definición de algunos términos.....	44
1.7.1 Potencial Biótico	44
1.7.2 Potencia invasiva	45
1.7.3 Extensión de la invasión	45
1.7.4 Control natural.....	45
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.1 Área geográfica de estudio:	46
2.2 Materiales:	48
2.3 Métodos	50
2.3.1 Tipo y diseño de investigación.....	50
2.3.2 Variables de la investigación.	51
2.3.3 Determinación del tamaño muestral.....	51
2.3.4 Colecta de caracoles	52
2.3.5 Reconocimiento del limneidos	53
2.3.6 Mantenimiento de los caracoles en laboratorio.....	55
2.3.7 Diseño experimental del ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	56
2.3.7.1 Obtención de miracidios.....	56
2.3.7.2 Infección experimental de caracoles con miracidios de <i>F. hepatica</i>	57
2.3.7.3 Disección de caracoles de infección inducida.....	58
2.3.7.4 Obtención de metacercarias.....	59
2.3.7.5 Inoculación de metacercarias en <i>R. norvegicus</i>	59
2.3.7.6 Mantenimiento y cuidado de las ratas	61
2.3.7.7 Análisis coproparasitológico de las ratas	62
2.3.7.9 Necropsias de las ratas.....	63
2.3.8 Identificación de la subespecie de <i>Chaetogaster limnaei</i>	65
2.3.9 Estimación de la eficiencia del control natural de <i>C. limnaei limnaei</i>	66
2.3.10 Cálculo de miracidios ingeridos por <i>C. limnaei limnaei</i> , por unidad de tiempo	66
2.3.11 Tratamiento estadístico	68
2.3.11.1 Cálculo del potencial biótico de <i>F. hepatica</i>	68

2.3.11.2 Estimación de la eficiencia de <i>C. limnaei</i> , mediante la prueba de Homogeneidad (Chi-cuadrado)	69
2.3.11.3 Estimación del número de miracidios devorados por <i>C. limnaei</i> por unidad de tiempo.....	69
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
3.1 Colecta de caracoles	70
3.2 Identificación de la especie de caracol por comparación comprensión	70
3.3 Mantención de caracoles	73
3.4 Diseño experimental del ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	73
3.4.1 Obtención de miracidios	73
3.4.2 Infección experimental de caracoles con miracidios de <i>F. hepatica</i>	74
3.4.3 Disección de caracoles de infección inducida	75
3.4.4 Obtención de metacercarias a partir de caracoles infectados en la naturaleza	87
3.4.5 Análisis coproparasitoscópico de las ratas	88
3.4.6 Necropsias de las ratas.....	89
2.3.6 Identificación de la subespecie de <i>C. limnaei</i> por comparación comprensión	100
2.3.7 Estimación de la eficiencia del control natural de <i>C. limnaei limnaei</i>	101
2.3.8 Estimación del número de miracidios devorados por <i>C. limnaei</i> por unidad de tiempo.....	102
DISCUSION	106
Colecta y mantención de limneidos	106
Diseño experimental del ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	107
Potencia invasiva de <i>F. hepatica</i>	111
Potencial biótico de <i>F. hepatica</i>	112
Eficiencia del control natural de <i>C. limnaei limnaei</i>	113
CONCLUSIONES.....	115
SUGERENCIAS.....	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
Anexo 1. Resumen de Antecedentes Internacionales.....	123
Anexo 2. Resumen de Antecedentes Nacionales y Locales	126
Anexo 3. Imagen satelital del punto de muestreo de caracoles en San Jerónimo	128
Anexo 4. Imagen satelital del punto de muestreo de caracoles en Katañiray.	129
Anexo 5. INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO I	130
Anexo 6. INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO II	131

Anexo 7 INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO III	132
Anexo 8. Método alternativo para la administración oral en ratas	133
Anexo 9. Método de sedimentación rápida (TSR, MSR) (Concentración por sedimentación sin centrifugación) (Lumbreras y col. 1962).....	134
Anexo 10. Volúmenes de sedimentos fecales (en mL) de ratas inoculadas con metacercarias de <i>F. hepatica</i> procedente de La Joya y Huayllapampa	136
Anexo 11. Número de huevos de <i>F. hepatica</i> encontrados en 0,2 mL de sedimento fecal de ratas inoculadas con <i>F. hepatica</i> procedente de La Joya (Anta) y Huayllapampa (San Jerónimo)	137

RESUMEN

Fasciola hepatica tiene un ciclo biológico complejo, que incluye un caracol limneido como intermediario, donde acontece su multiplicación larval partenogenética, y un hospedador definitivo en el que acontece su reproducción sexual. El **objetivo** fue realizar un estudio experimental del ciclo de *F. hepatica*, en un limneido y *Rattus norvegicus*, con un método alternativo para la mantención de limneidos de infección inducida, estimando el potencial biótico (r), la potencia invasiva (PI), extensión de la invasión (EI) de *F. hepatica*, y determinar la eficacia de *Chaetogaster limnaei* como su controlador natural en condiciones controladas de laboratorio. Los caracoles para este estudio fueron colectados los meses de diciembre del 2010 a abril del 2011, identificados por morfometría de sus conchas, y mantenidos en el laboratorio. Los huevos de *F. hepatica* se obtuvieron del contenido de la vesícula y conductos biliares de 3 ovinos con fasciolosis, se tamizaron y lavaron en agua hervida enfriada, para incubarlos a temperatura constante de 26°C hasta la eclosión de miracidios, con los que se procedió a la infección experimental de 215 caracoles, luego cada tres días se diseccionaron 5 caracoles realizando el seguimiento de la cuantía de estadios de *F. hepatica*. Además se obtuvieron metacercarias de caracoles infectados en la naturaleza, que fueron inoculados en número de 20, mediante un vehículo de administración oral de infección, a 6 ejemplares de *R. norvegicus* mantenidos en bioterio de condiciones ambientales controladas. Realizándoles su parasitoscopia mediante la técnica de concentración simple por sedimentación desde los 86 hasta los 100 días de infección, sacrificándolas seguidamente para su necropsia. Además se realizó la inoculación de 10 miracidios en dos grupos de caracoles limneidos: 30 conteniendo al ectosimbionte *C. limnaei* y 30 que no lo contenían. **Resultados:** La colecta de caracoles mostró una abundancia de captura por unidad de esfuerzo entre 60 y 150. Los limneidos fueron mantenidos in vitro con una eficacia del 75,81%. El modelo de crecimiento exponencial es el que mejor se ajusta a la dinámica de *F. hepatica*, con un potencial biótico de 6,69%, una media de 203 cercarias por miracidio y 270 cercarias por caracol. En *R. norvegicus*; la producción de huevos/adulto de *F. hepatica* fue de $9135,70 \pm 2196,8$; la potencia invasiva de 6,67 a 8,33% y la extensión de la invasión de 66,67%. *C. limnaei* tiene una eficacia de control natural de fasciolosis del 84% en caracoles limneidos, siendo considerado *C. limnaei* como depredador de miracidios de *F. hepatica*, teniendo los resultados un potencial valor como medida de control contra la fasciolosis.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por el digeneo estenoxénico *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Wilford, 1978), tremátodo que infecta el parénquima y conductos biliares del ganado ovino, bovino, caprino, porcino, equino, otros animales herbívoros y accidentalmente al hombre (Becerril & Romero, 2004), mediante el consumo de berros frescos, alfalfa, lechugas y agua de bebida (Carrada, 2007), causando un proceso crónico que produce trastornos digestivos y de la nutrición. (Quiroz, 2003; Euzéby, 2001).

Se estima que la población humana afectada por la fasciolosis según la OMS se sitúa entre los 2,4 (Becerra, 2000; Rim *et al.*, 1994) y 17 millones de personas (Hopkins, 1992) y un total de 180 millones en riesgo de contraer la enfermedad (Who, 1995). Además, si tenemos en cuenta la falta de conocimiento sobre la enfermedad en humanos en muchos países, el número de personas afectadas podría ser mucho mayor (Mas-coma *et al.*, 1999). La fasciolosis es considerada como una importante parasitosis veterinaria, en la actualidad, su presencia sigue provocando altas pérdidas económicas en la industria ganadera a causa de su patogenicidad. Las pérdidas directas por muertes o decomisos son cuantiosas para la industria cárnica, aunque la mayor frecuencia de la forma subclínica hace que las pérdidas indirectas sean superiores (Ordoñez, 2009). No obstante, son más difíciles de cuantificar y se refieren a la reducción de los índices de crecimiento y conversión, a la disminución de la producción láctea y cárnica, a los efectos adversos en la cantidad y calidad de la lana, a interferencias en la fertilidad y fecundidad, a la mayor receptividad frente a otras infecciones, así como costosos gastos terapéuticos (Rojo & Ferré, 1999).

Las metacercarias ingeridas, desenquistan en la luz del intestino que migrar hacia el hígado, alimentándose de hepatocitos y causando necrosis hemorrágicas (Carrada, 2007). Dentro de los conductos biliares, desarrolla el estado adulto que suele autofecundarse o hacer fecundación cruzada (Carrada, 2007), generando huevos sin embrionar que pasan al intestino y salen con la materia fecal, debiendo llegar al agua fresca, de curso lento e incubarse para eclosionar a miracidios (Euzéby, 2001) que buscan un caracol hospedador, multiplicándose por partenogénesis dentro de sus tejidos, dando origen a esporocistos y de estos, a redias de primera y segunda generación. Cada redia produce muchas cercarias, que se enquistan sobre las plantas

acuáticas, convirtiéndose en metacercarias, moderadamente resistentes a los cambios ambientales. La ecología de *F. hepatica* está estrechamente relacionada con sus intermediarios gasterópodos de la familia Lymnaeidae.

Los estudios acerca de la biología de *F. hepatica*, de su caracol hospedador y sus múltiples interrelaciones con otros organismos., son necesarios para descubrir nuevas medidas de prevención y más eficaces (Wilford, 1977). En la actualidad los estudios sobre el cultivo de moluscos intermediarios de *F. hepatica* en la Región Neotropical son escasos (Mas-coma *et al.*, 1999), la presente investigación está dirigida a realizar un diseño experimental del ciclo biológico de *F. hepatica* in vitro en caracoles y ratas para deducir su potencial biótico; potencia invasiva y extensión de la invasión en su hospedero vertebrado; y la eficacia de uno de sus controladores naturales. Para ello se propone un método de cultivo y mantenimiento de caracoles hospedadores limneidos inducidos experimentalmente a infección con miracidios de *F. hepatica*, mantenidos en suficiente número y bajo condiciones controladas en laboratorio; valorando el desarrollo y multiplicación de los estadios larvales de *F. hepatica*, y de esta forma poder contar con la base experimental para desarrollar parte de su ciclo biológico; y el cálculo de la eficiencia de su controlador natural *Chaetogaster limnaei* Von Baer 1827, durante su mantenimiento en acuarios en el laboratorio. Además se obtuvieron in vitro metacercarias de caracoles ya infectados naturalmente que fueron inoculadas en ratas de la especie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, raza Holtzmann – albus, criadas en el bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la UNSAAC como modelo de hospedador vertebrado para inducir el ciclo parasitario de *F. hepatica*, estimando consiguientemente su potencial biótico mediante el análisis de deposiciones por el método de concentración rápida por sedimentación, la potencia invasiva y extensión de la invasión de *F. hepatica* en estas ratas de presente diseño experimental para evaluar la factibilidad de su utilización en futuros estudios. Realizándose el trabajo de campo en la comunidad de Katañiray (distrito de Ancahuasi, Provincia de Anta) y en el Distrito de San Jerónimo, ambos en el departamento del Cusco, de donde fueron obtenidos los caracoles.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de la alta disponibilidad de un amplio número de antiparasitarios, la infección en humanos y animales de abasto no disminuye en nuestro medio, debido probablemente a que el control de esta zoonosis, no son muy considerados los factores biológicos, climáticos y topográficos (Carrada, 2007; Quiroz, 2003), para combatir a un ser viviente hay que conocerlo bien (Boch & Suppered, 1978). Estos antecedentes demuestran la necesidad de estudiar este trematodo para planificar y llevar a cabo medidas de control de esta zoonosis, sobre todo en nuestra región.

Las investigaciones sobre *F. hepatica* requieren de la cría de los hospederos intermediarios en el laboratorio con vistas a mantener el ciclo, así como para el desarrollo de numerosos métodos de diagnóstico y control de esta parasitosis (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1995). Los estudios acerca de su biología y de sus múltiples interrelaciones con otros organismos como *C. limnaei* permiten desarrollar métodos de prevención y de lucha más propicios (Boch & Suppered, 1978), y también para obtener *F. hepatica* experimentalmente.

Por otra parte, los adultos de *F. hepatica* en hospedadores humanos y ratas inducen una considerable reacción tisular con calcificación de los conductos biliares (Boray *et al.*, 1984). En este contexto, *R. norvegicus* es un modelo adecuado en fasciolosis humana por su nivel de resistencia, similar al de los humanos (Boray *et al.*, 1984). Además, tanto en la fasciolosis humana como en ratas, el parásito con frecuencia suele localizarse en el canal biliar común, que se dilata (Valero *et al.*, 1998), en la fasciolosis humana, el canal biliar común mide entre 7-30 mm, y en la fasciolosis en ratas, dicho canal biliar oscila entre los 4-17 mm (Ordoñez, 2009). Esta coincidencia en el tamaño del microhábitat permite considerar que el modelo rata es adecuado para estudiar el desarrollo del trematodo adulto (Ordoñez, 2009) y extrapolar los resultados a infecciones humanas, por ello en la presente investigación se estima la Potencia Invasiva y Extensión de la Invasión de *F. hepatica* y su mecanismo para generar una cantidad de huevos al medio externo inmediato, considerando a la rata como mejor hospedador experimental por su baja mortalidad; fácil y económico manejo; lo cual induce en el presente estudio a utilizarla.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el país no se han reportado estudios sobre aspectos biológicos y ecológicos del desarrollo de los estadios larvales de *F. hepatica* en limneidos intermediarios y su continuación en *R. norvegicus* para el tremátodo adulto (biomodelo de hospedador vertebrado) en CONDICIONES EXPERIMENTALES, por lo que esta investigación constituye un primer estudio del ciclo biológico de *F. hepatica* in vitro para estimar su potencial biótico; potencia invasiva y extensión de la invasión; y toma en cuenta la utilización de *C. limnaei* controlador natural (existente en aguas de nuestra zona) de *F. hepatica*, con gran certeza debido a su facilidad de uso, siendo necesario conocer su eficacia de control, para aplicarlo en zonas infestadas de limneidos susceptibles a fasciolosis. Considerando este estudio experimental factible en su utilización en futuras investigaciones.

Esta investigación constituye una primera fuente para posteriores trabajos aplicativos, haciendo posible la disponibilidad de los 7 estados del ciclo de *F. hepatica* (huevo, miracidio, esporocisto, redia, cercaria, metacercaria y adulto) obtenidos experimentalmente en laboratorio.

HIPÓTESIS

El seguimiento de la cuantía de estadios de *Fasciola hepatica* observados en caracoles limneidos mantenidos en laboratorio y *Rattus norvegicus*, de infección inducida, utilizados como modelo de fasciolosis en el presente estudio experimental, permiten estimar el potencial biótico de *Fasciola hepatica*, su potencia invasiva y extensión de invasión en las ratas y la eficacia de *Chaetogaster limnaei* como su controlador natural al enfrentarlo a este.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Realizar un estudio experimental del ciclo de *F. hepatica*, proveyéndole como hospedero intermediario a un limneido y como hospedero definitivo a *R. norvegicus*. Y evaluar la eficacia de *C. limnaei* como su controlador natural en laboratorio.

Objetivos específicos:

1. Obtener caracoles limneidos de su medio natural, para su mantenimiento e infección con miracidios de *F. hepatica* en laboratorio.
2. Estimar el potencial biótico de *F. hepatica* observando el desarrollo y propagación de sus estadios larvales dentro de su hospedador intermediario limneido y cuantificando la cantidad de huevos emitidos por parásito en su hospedador definitivo *R. norvegicus*, en condiciones controladas de laboratorio.
3. Determinar la potencia invasiva (PI) y extensión de la invasión (EI) de *F. hepatica* inoculando metacercarias obtenidas in vitro procedentes de caracoles infectados en la naturaleza en *R. norvegicus*.
4. Determinar la eficacia de *C. limnaei*, controlador natural de tremátodos, inoculando miracidios en caracoles portadores y no portadores de este anélido y cuantificando el número de miracidios de *F. hepatica* que devoran por unidad de tiempo.

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Internacionales

Mas-Coma, S., Funatsu, R. & Bargues, M. (2001) Inglaterra

Mencionan que la ocurrencia de *F. hepatica* y caracoles limneidos a gran altitud en América del Sur, en el Norte de Bolivia Altiplano (3800-4100 m), presenta la más alta prevalencia e intensidad de fasciolosis humana conocida (31,2 - 38,2%). Realizaron infecciones experimentales de *L. truncatula* con miracidios de *F. hepática* aislados de ganado altiplánico, estudiando los siguientes aspectos: desarrollo del miracidio dentro del huevo, infectividad de los miracidios, período pre-patente, periodo de liberación, la cronobiología de la emergencia de cercarias y el número de cercarias liberadas por caracol. Con los siguientes resultados en muestras de procedencia ovina a 20°C: El desarrollo de miracidios dentro del huevo es de 58 días, de 32 caracoles inoculados se infectaron el 69,2%, los cuales presentaron un periodo pre-patente de 48 a 58 días (con una media de 49,6), liberación de cercarias de 47 a 88 días, con 384 a 562 (con una media de 451,8) cercarias liberadas por caracol. Al comparar con los registros europeos las características de desarrollo de *F. hepatica* y *L. truncatula*, observaron un período más largo para la liberación, una mayor producción de metacercarias, y una mayor capacidad de supervivencia de los caracoles limneidos infectados del Altiplano. Concluyen que al parecer estas diferencias favorecen la transmisión y pueden ser interpretadas como estrategias asociadas a la adaptación a condiciones de altura.

Sánchez, R., Pereira G. & Sánchez, J. (1995) Cuba.

Evaluaron un método para el cultivo masivo de *Fossaria cubensis* (= *Lymnaea cubensis*) hospedero intermediario principal de fasciolosis en Cuba. Para ello diseñaron un algario a base de un cultivo de algas cianofitas en placas de petri de 12 cm de diámetro con sustrato fangoso y altos niveles de nitrato (0,13 g/L) y de calcio (0,92 g/L). Luego de 15 días de incubación en luz continua, estas placas fueron utilizadas como acuarios para la cría de los moluscos. Obteniendo como resultado una efectividad del 95% y la disminución

del tiempo generacional de los caracoles garantizando el crecimiento y reproducción de *F. cubensis* que permiten su producción masiva para investigaciones sobre fasciolosis.

Abrous, M., Rondelaud D. & Dreyffus, G. (2001) Estados Unidos.

En condiciones de laboratorio llevaron a cabo la infección de *L. truncatula* con *F. hepatica* para determinar si el stress en el caracol justo antes de la exposición a los miracidios influye en la prevalencia de la infección, generación de redias, y liberación de cercarias de *F. hepatica*. Utilizaron tres métodos de estrés: exposición de los caracoles a agua filtrada a través de membranas de miliporos, efecto de sumergirlos en agua de entre 6 – 8 °C por 15 minutos y la inmersión de los caracoles en solución de detergente de bajas concentraciones. Obteniendo como resultado que los caracoles sometidos a stress estaban notablemente más infectados con *F. hepatica* (93-96% vs 48-50% en controles). El número de redias no mostro variación entre los grupos problema y control. Ni diferencias en la producción de cercarias.

Koie, M., Christensen, N. & Nansen, P. (1976) Alemania.

Mencionan que los huevos de *F. hepatica* tienen una superficie lisa con un círculo fracturado en uno de sus extremos denominado el opérculo que se apertura para dar paso al miracidio. El epitelio del miracidios está cubierto por largos cilios. Cuando el miracidio vibra a un ritmo ultrasónico los cilios de las células epiteliales de las 4 filas posteriores se rompen dejando sólo las hileras longitudinales de pedazos de cilios, sin embargo los cilios de las hileras anteriores son todavía retenidas. La papila apical es un surco naciente desde las partes dorso ventral, los cilios presentan pequeños órganos sensoriales. La penetración dentro del caracol (*Lymnaea truncatula*) y su transformación a esporocisto está separada en tres fases: (1) Menos de un minuto después del ataque al caracol, el miracidio pierde sus cilios. (2) Los cilios residuales son arrancados violentamente y después de 5 minutos son desechados y el miracidio en 15 minutos trata de situarse lo más interior del caracol que puede, durante este periodo el miracidio gasta mucha energía en contracciones y relajaciones de

su cuerpo. (3) La final penetración del miracidio al epitelio el caracol dura 15 minutos. La superficie del miracidio es suave con una continuación citoplasmática y la papila apical. Siendo el tegumento del esporocisto un sincio. Después de pocos días el tegumento del esporocisto presenta micro-vellos y la papila apical y las estructuras sensoriales desaparecen.

Bouix-Busson, D., Rondelaud, & Prevost, J. (1983) Francia.

Reportaron estudios de la infección de *Lymnaea glabra* por *F. hepatica* en relación con: 1) El número de miracidios por caracol, 2) el tamaño del caracol (0,5 mm, 1 mm o 2 mm) en la exposición de miracidios. La evolución de la infección en caracoles fue observado sólo en grupos de 0,5 y 1 mm de longitud en días post-exposición. En grupos de 0,5 mm de longitud, el porcentaje de caracoles infectados mostró un máximo en infecciones de cinco miracidios por caracol. En el grupo de 1 mm de longitud, no hubo caracoles infectados hasta 5 miracidios por caracol; el porcentaje de caracoles infectados incrementa en relación con el número de miracidios usados por caracol. *L. glabra* es un hospedador intermediario accidental de *F. hepatica*.

Rondelaud, D. & Barthe D. (1987). Alemania

Llevaron a cabo estudios experimentales con redias de *F. hepatica* contenidas en dos poblaciones de caracoles *Lymnaea truncatula*, que individualmente fueron expuestos a un miracidio único y fijo, los caracoles se cultivaron a 20 ° C. Realizando observaciones histológicas después de la muerte de los caracoles entre los días 74 y 81 posterior a la infección. El número de redias y demás estadios larvales por caracol incrementa con la longitud de la concha. Un número constante de redias libres se observó en los caracoles que miden 11 mm a más de tamaño. No hubo límite en el incremento del número de los diferentes estadios larvares, aunque fueron menores para los primeros estadios larvales. El número de larvas por redia aumenta con el tamaño del caracol, que es siempre superior en la primera generación que en las generaciones siguientes. El 65% a 80% de estas redias maduras que producen las cercarias pertenecían a la primera generación y el primer grupo de la segunda generación.

Belfaiza, M., et al. (2004). Inglaterra.

Llevaron a cabo la infección de caracoles *Galba truncatula* con dos miracidios con el propósito de determinar la influencia de la calidad de comida en la frecuencia de infección de 1 o 2 esporocistos y de analizar el impacto en el desarrollo normal, o anormal de la generación de redias, y verificar su consecuencia en la producción de cercarias. Esta investigación fue llevada a cabo en caracoles criados a 20°C proveyéndoles de lechuga y comida comercial de peces (Tetraphyll) como alimento hasta su muerte. La infección con dos esporocisto con normal generación de redias fue del 43.9% del total de caracoles (N= 296). Infecciones de un esporocisto se desarrollaron en los otros caracoles, con desarrollo normal de generación de Redias en 53.7% y anormal desarrollo (la primera redia madre degenerada tempranamente) en 2.4%. El número de cercarias liberadas en infecciones de 1 y 2 esporocistos no tuvieron diferencia significativa. Cuando los caracoles longevos murieron, tuvieron una producción de cercarias de 19.8 - 20.7% por redia libre (esencialmente por Redias R2b/R3a and R3b/R4a). El incremento en la frecuencia de la infección de dos esporocistos demostró que la calidad de la comida tiene un efecto significativo en la cantidad de redias de *F. hepatica* desarrolladas dentro de *G. truncatula*.

Lee, C., Cho, H. & Lee, C. (1995). Suiza.

Utilizaron tres grupos de caracoles *Lymnaea viridis* cada uno infectado con 3 - 5 miracidios de *F. hepatica*, para observar la producción de metacercarias. En los tres grupos la liberación de cercarias se inicio al día 27 post-infección. La duración y tipo de liberación de cercarias varía de caracol en caracol a cada grupo. Caracoles infectados con tres o cinco miracidios produjeron más metacercarias que los infectados con un solo miracidio. La producción total de metacercarias fue influenciada por la temperatura (20° C) en la cual los caracoles fueron mantenidos durante la infección.

Prepelitchi, L. et al. (2003). Argentina.

Reportaron la primera evidencia de infección natural *Lymnaea columella* con *Fasciola hepatica* al norte de la Provincia de Corrientes, Argentina. En una

población de 601 caracoles que fue colecta en mayo del 2003 del norte de la provincia de Corrientes Argentina, de 500 caracoles examinados, 44 (8,8%) presentaban la infección con *F. hepatica*. Parásito que fue identificado en base a las características morfológicas de sus cercarias y de huevos y adultos desarrollados en ratas Wistar, que tuvieron un periodo pre-patente post infección de 44 – 49 días. Concluyen que la transmisión zoonótica de la fasciolosis ha sido recientemente establecida en *L. columella* en la región de Corrientes Argentina.

Prepelitchi, L. (2009). Argentina.

Menciona que la fasciolosis, es una parasitosis de gran importancia para el ganado doméstico porque ocasiona importantes pérdidas económicas a nivel mundial. En Argentina es endémica y la cuarta enfermedad más importante para el ganado vacuno. Con el objetivo de describir la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en una región de Argentina con clima subtropical, realizó muestreos estacionales entre la primavera de 2002 y de 2005 en un establecimiento en el norte de la Provincia de Corrientes. Identificó al caracol hospedador intermediario, caracterizó su hábitat y estudió su abundancia, estructura y dinámica poblacional. Detectó un foco de transmisión de *F. hepatica* bien establecido con altas prevalencias, *L. columella* fue el único hospedador intermediario hallado. Colectó en total 7.851 *L. columella* en Bañados y Malezales, dos ambientes típicos del Macrosistema del Iberá. Concluye que la dinámica de transmisión de *F. hepatica* en la zona de estudio estuvo influenciada principalmente por la disponibilidad de agua.

Olazabal, E., et al. (1999). Cuba.

Realizaron dos experimentos, el experimento I con el método de la necropsia de caracoles para obtener metacercarias y el experimento II que fue desarrollado para determinar la potencia invasiva de las metacercarias obtenidas en un biotopo artificial, usando ratas Wistar, inoculados con 20 metacercarias, obteniendo por disección un total de 1 442 metacercarias con una media de 12,87 por hospedero. La potencia invasiva (PI) y la extensión de la invasión (EI) en las ratas fue de PI=23%; EI= 80%. Se concluye que la potencia invasiva y

extensión de la invasión obtenida valida su uso con modelos de *F. hepatica* en ratas con dosis apropiada de 20 metacercarias.

Ordoñez, D., (2009) España.

Indica que la patogénesis de la fasciolosis depende de la carga parasitaria y del tamaño de los trematodos adultos. En este estudio se utilizó el modelo experimental de fasciolosis en rata Wistar por ser un modelo animal útil que mimetiza la fasciolosis crónica avanzada en humanos. infectando ratas con 20 metacercarias/rata vía oral, llevando a cabo el estudio de la influencia de la intensidad individual de infección por rata (entendiendo la intensidad de infección como el número de trematodos por hospedador en el canal biliar principal) sobre: a) el desarrollo del adulto; b) el tiempo comprendido entre la ingestión de metacercarias y la presencia de huevos en heces (el periodo prepatente, pp) y c) el número de huevos por gramo de heces y por adulto (hgh/adulto). Los resultados obtenidos muestran que el “crowding effect” se manifiesta cuando las medidas corporales del trematodo adulto se aproximan a los valores máximos alcanzados en la fase de cronicidad avanzada. En las últimas fases de desarrollo, las tasas de crecimiento de las medidas corporales son más altas cuando menor es la carga parasitaria. El pp y los hgh/adulto se muestran dependientes del nivel de infección, disminuyendo cuando la carga parasitaria aumenta. Esto significa que el número de huevos por gramo de heces tiende a desestimar la carga parasitaria. En todas las medidas biométricas analizadas, los valores del tiempo en el punto de inflexión en el modelo logístico son similares a los datos empíricos sobre el pp, es decir, el momento donde empieza la emisión de huevos. La consideración de estos factores es de interés tanto en estudios epidemiológicos, como en estudios experimentales in vivo sobre la acción de fármacos antihelmínticos y vacunas, patología, inmunología y resistencia.

Ibrahim, M. (2007). Alemania.

Ejecuta un estudio de la dinámica de población de *C. limnaei* en caracoles de agua dulce y sus efectos como potencial regulador de larvas de trematodos, así como la prevalencia y la intensidad de *C. limnaei* en relación a la

especie y tamaño de su hospedador. De trece especies de caracoles examinados cinco especies presentaba *C. limnaei*. Encontrando correlaciones positivas entre el tamaño de acogida y la prevalencia combinada y la intensidad media en todos los caracoles. Concluyendo que *C. limnaei*, es simbióticamente asociado con caracoles vectores de enfermedades parasitarias, pudiendo tener implicaciones importantes en relación con el control biológico y / o cambios en la epidemiología de estos parásitos.

Rodgers, J., et al. (2005). Estados Unidos

Realizan un estudio de las interacciones inter-específicas entre un comensal (*C. limnaei limnaei*), un parásito (*Schistosoma mansoni*), y un caracol acuático (*Biomphalaria glabrata*). Observando que la prevalencia de la infección de *Schistosoma* fue significativamente mayor en los caracoles que carecían de los *C. limnaei limnaei* en relación con aquellos que fueron colonizados por estos comensales, indicando que *C. limnaei limnaei* puede proteger al caracol hospedero de infecciones por trematodos. Este hallazgo parece evidenciar un resultado directo de los comensales frente a la estimulación indirecta del sistema inmunológico. El crecimiento del caracol y su reproducción se vieron afectados por la presencia de *C. limnaei limnaei* y *S. mansoni*. La prueba de ANOVA reveló un efecto significativo tanto de la presencia de *C. limnaei limnaei* y el parásito en el crecimiento de *B. glabrata* en un estudio de 5 semanas con caracoles colonizados con *C. limnaei limnaei* infectados con *S. mansoni* demostrando un mayor crecimiento. Los caracoles expuestos, pero no infectadas, por *S. mansoni* demostrando un menor crecimiento, independientemente de los colonización comensales. La colonización de *C. limnaei limnaei* no tuvo efecto sobre la producción de huevos de su hospedador, pero estos caracoles infectados con *S. mansoni* produce huevos significativamente más que los individuos de otros grupos de tratamiento. La supervivencia se mantuvo por encima del 85% en todos los grupos de tratamiento. Las consecuencias ecológicas de los estos resultados se discuten.

Rajasekariah, G. (1978). Suiza.

Estudia la ingestión de cercarias de *F. hepatica* por *C. limnaei* en *Lymnaea tomentosa*. Indica que *Lymnaea tomentosa*, un huésped intermediario de *F. hepática* en condiciones naturales es muy infestado con el anélido ectocommensal, *C. limnaei*. Observando en el laboratorio que estos anélidos destruyen las fases larvianas de *F. hepatica*. La asociación comensal de *C. limnaei* y el caracol hospedero intermedio tiene potencial valor como medida de control contra la fasciolosis enfermedad de importancia económica.

1.2 Antecedentes Nacionales y Locales

Iturbe, P. & Muñiz F. (2010). Cusco, Perú.

Estudiaron la eclosión de miracidios expuestos a luz y oscuridad a partir de huevos de *F. hepatica* provenientes de vesículas biliares de vacunos y ovinos hospederos para establecer si existen diferencias significativas en el tiempo de evolución de los mismos. El desarrollo más prolongado correspondió a los huevos incubados en oscuridad, siendo de 404 h y 439 h en los huevos de procedencia ovina y vacuna, respectivamente, con un valor medio de 422 h. El período de desarrollo más corto fue para los huevos incubados en presencia de luz. En los de procedencia ovina y vacuna fue de 278 h y 279 h, respectivamente, con un promedio de 278.5 h, al aplicar la prueba de T de Student constataron que la luz sí influye en el tiempo de eclosión de huevos de *F. hepatica*, así como la procedencia de hospedero.

Londoño, P., et al (2009) Cusco, Perú.

El objetivo de su estudio fue determinar la presencia de formas larvianas de *F. hepatica* y las especies de caracoles hospederos intermediarios de *F. hepatica* en altitudes superiores a 4000 msnm. Trabajaron en tres altitudes (4000 a 4200, 4200 a 4300, y 4300 a 4500 msnm) colectándose 150 caracoles por cada altitud en la época de lluvias (enero-marzo) del 2004. El área pertenece a la Estación Experimental de la Raya, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Se utilizaron 50 caracoles para la medición de la concha, 50 para observar el aparato reproductor y la rádula a fin de identificar las especies, y 50

para verificar la presencia de formas larvarias de *F. hepatica*. Se encontró caracoles de la especie *L. viatrix* entre 4000 a 4200 msnm y de la especie *Pseudosuccinea columella* entre 4200 a 4500 msnm. El porcentaje de infestación de los caracoles con las formas larvarias de *F. hepatica* fue de 48, 46 y 36% a 4000-4200, 4200-4300, y 4300-4500 msnm, respectivamente, demostrando que el parásito puede sobrevivir sobre los 4000 msnm. La relación entre el nivel de infestación y altitud fue inversamente proporcional.

Larrea, H., et al. (2007) Lima, Perú.

Demostraron la infección natural y experimental de los caracoles limneídos peruanos con estadios larvales de *F. hepatica*. Las investigaciones se realizaron entre los años 1997 y 2006, examinándose especímenes procedentes de diez localidades del país, reconocidas como zonas de fasciolosis. Las especies *Lymnaea columella* Say 1817, *Lymnaea viatrix* Orbigny 1835, *Lymnaea diaphana* King 1830 y *Lymnaea cousini* Jousseau 1887 fueron identificadas sobre la base de las características morfológicas de la concha, sistema reproductor y rádula. En cada localidad, del total de especímenes colectados, la mitad fue colocada en placas petri con la finalidad de observar la emergencia espontánea de las cercarias; los restantes fueron diseccionados a fin de observar la presencia de estadios inmaduros. Para la inoculación de miracidios se utilizaron individuos de *L. viatrix* y *L. columella* procedentes de Lima, *L. diaphana* de Arequipa y *L. cousini* de Huánuco. Los caracoles fueron criados bajo condiciones controladas de laboratorio. Los huevos de *F. hepatica* fueron obtenidos de adultos provenientes de hígados parasitados de ovinos, luego fueron lavados con agua destilada e incubados en placas petri a 25° C. Para la infección experimental, de manera individual, se colocaron caracoles en placas petri con agua destilada usando 10 miracidios por cada uno. Los índices de infección natural y experimental fueron del 12% y 28% en *Lymnaea columella* y del 27% y 70% en *Lymnaea viatrix*, respectivamente. *Lymnaea diaphana* y *Lymnaea cousini* no presentaron infección natural y demostraron no ser susceptibles a la infección experimental.

1.3 *Fasciola hepatica*

1.3.1 Historia del descubrimiento del ciclo de *F. hepatica*

Fue el primer trematodo descrito en la historia de la parasitología, es un helminto, trematodo, digeneo conocido como la duela hepatica en el mundo (Cordero del Campillo *et al*, 1999) causante de la fasciolosis que es una enfermedad de importancia económica de animales de abasto, en particular de vacunos y ovinos, y ocasionalmente el hombre. Comúnmente denominada en el Perú como K'allutaca o Alicuya, *F. hepatica* se caracteriza por tener un ciclo de vida complejo en el cual se incluye a un caracol hospedero intermediario dentro del cual ocurre la multiplicación de larvas. (Dalton, 1999).

Se resume en la siguiente tabla:

Tabla 1. Acontecimientos en el descubrimiento del ciclo de *F. hepatica*

Autor/Año	Acontecimiento
De Brie, 1379	Primero en observar a <i>F. hepatica</i>
Redi, 1688	Desaprueba la teoría de la generación espontanea
Swammerdam, 1737	Primero en observar cercarias diseccionando un caracol
Müller, 1773	Observa cercarias nadando en el agua
Zeder, 1803	Describe la eclosión de miracidios de huevos de <i>F. hepatica</i>
Nitzsch, 1807	Observa el enquistamiento de cercarias
Bojanus, 1818	Describe a redias y el desarrollo de cercarias
Steenstrup, 1842	Publica la teoría de la alternancia de generaciones
La Valette St George, 1855	Observa la infección de caracoles por miracidios
Wagener, 1857	Observa la penetración de caracoles por miracidios y el subsecuente desarrollo de la redia
Weinland, 1875	Sugiere que el desarrollo de los estados larvales de <i>F. hepatica</i> ocurren en <i>L. truncatula</i>

Leuckart, Thomas, 1812	Confirman que <i>L. truncatula</i> es hospedador intermediario de <i>F. hepatica</i> y trabajan aisladamente el ciclo de <i>F. hepatica</i>
Lutz, 1892	Confirma que los animales herbívoros adquieren adultos por la ingestión de metacercarias de <i>F. hepatica</i>
Sinitsin, 1914	Confirma la ruta de migración de <i>F. hepatica</i> en dirección al hígado

Dalton, 1999

1.3.2 Posición Taxonómica de *Fasciola hepatica*

Reino: Animal

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Trematoda

Sub clase: Digenea

Orden: Schinostomida

Familia: Fasciolidae

Género: Fasciola

Especie: *Fasciola hepatica* (Linneo, 1758).

Quiroz, 2003

1.3.3 Caracterización morfológica

La fase adulta de *F. hepatica* viene caracterizada fundamentalmente por presentar un cuerpo foliáceo, aplanado dorso-ventralmente, con una longitud que se encuentra comprendida entre 20 y 30 mm y una anchura variable entre 6 y 13 mm (Mascoma, 2001). En el extremo anterior presenta una proyección cónica bien definida denominada como cefálico de unos 3 ó 4 mm de longitud, el cuál se ensancha en su parte inferior para formar una especie de hombros a partir de los cuales el cuerpo se estrecha progresivamente hasta el extremo posterior redondeado. Las ventosas son relativamente

pequeñas, llegando a ser la ventral un poco más grande que la oral. En la porción apical del cono cefálico se localiza la ventosa oral musculosa, de alrededor de 1 mm de diámetro, la cuál rodea la apertura oral del verme al exterior. Es en este punto, en la ventosa oral, donde comienza el tubo digestivo del digénido, el cuál continúa con una prominente faringe musculosa seguida de un corto esófago. Éste, da lugar mediante una serie de bifurcaciones consecutivas a los ciegos intestinales, es decir, el esófago se bifurca en dos ramas principales de ciegos intestinales que a su vez se ramifican en un complejo sistema de ramas laterales secundarias y terciarias (Boray, 1984). En la zona ventral del parásito, cercana a la ventosa oral, se encuentra la ventosa ventral o acetábulo, que mide alrededor de 1,6 mm de diámetro (Boray, 1984; Boch & Suppered, 1978). El tegumento se encuentra recubierto de espinas que se disponen dirigidas hacia atrás, las cuales alcanzan, en general, hasta la mitad de la cara dorsal y hasta el último tercio de la región ventral. La función principal del tegumento es ayudar a los fasciólidos a mantener la homeostasia, esencial para la supervivencia del parásito dentro del hospedador definitivo.

El adulto de *F. hepatica* es hermafrodita. Si bien la autofecundación es obviamente posible, parece ser que la fertilización cruzada es el modo más común de reproducción sexual. Los dos testículos se disponen en tándem, en la zona media posterior del cuerpo y se encuentran muy ramificados. De estos testículos emergen dos conductos deferentes que se unen formando la vesícula seminal. En la bolsa del cirro, situada en la ventosa ventral, se encuentran la vesícula seminal posterior, una región prostática media y un cirro anterior musculoso. Dicha bolsa se abre al exterior a través de un delicado conducto precirral en el atrio genital, situado frente a la ventosa ventral, en posición preacetabular. Las glándulas vitelógenas también presentan una gran ramificación y contienen los folículos vitelinos que llenan la mayor parte de las porciones laterales del cuerpo y convergen justo debajo de los testículos. El ovario adopta una forma dendrítica y se halla situado en el lado derecho, frente al testículo anterior. Existe un corto canal de Laurer. El ootipo, de estructura esférica, que no es funcional, se encuentra en la línea media, detrás del ovario y está rodeado por una masa esférica de glándulas de Mehlis. El útero describe una trayectoria tortuosa entre el ootipo y el poro genital, en el que se abre el conducto precirral. Los diversos

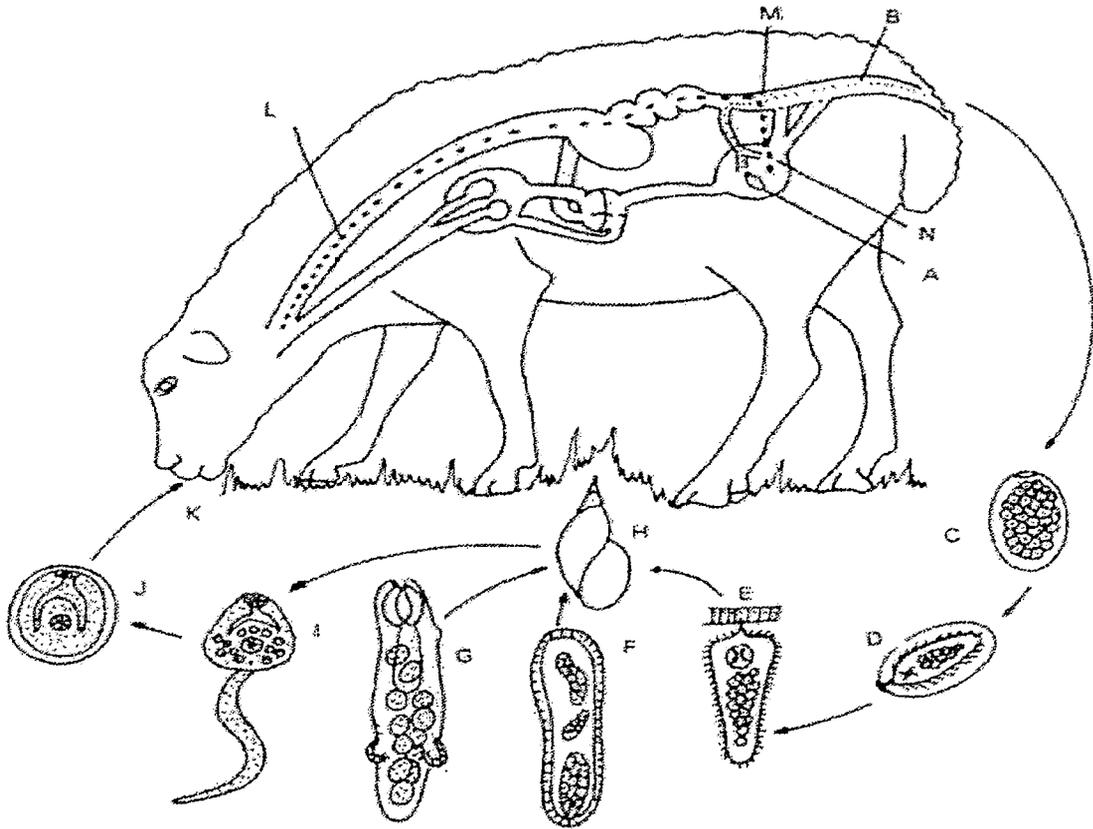
componentes del huevo fértil se reúnen en el segmento proximal del útero. La cubierta de los huevos del parásito, procede fundamentalmente de los gránulos contenidos en las denominadas células vitelinas; dichas células albergan dos componentes necesarios para la esclerotización de la cubierta: los polifenoles y las proteínas que dan lugar a la esclerotina. El papel de las glándulas de Mehlis en la formación de la cubierta del huevo es secundario, siendo su principal función la de secretar un líquido que aumenta la actividad de las glándulas prostáticas que mantienen activos a los espermatozoides (Cardozo, 2009).

1.3.4 Ciclo biológico de *F. hepatica*

F. hepatica sigue un ciclo biológico diheteroxeno, es decir, alterna entre un hospedador intermediario (respecto al cual presenta una alta especificidad de tipo estenoxeno) y un hospedador definitivo (respecto al cual no es tan específico). El hospedador intermediario es un invertebrado (molusco gasterópodo) y el hospedador definitivo es un mamífero (Boray, 1984).

El ciclo posee 5 fases bien definidas (Duménigo & Espino, 1999; Dalton, 1999) (i) salida de los huevos del hospedero definitivo al medio ambiente y su subsecuente desarrollo; (ii) eclosión de miracidios, su búsqueda y penetración a un caracol hospedador intermediario, (iii) desarrollo y multiplicación de los estadios larvales dentro el caracol; (iv) emergencia de cercarias del caracol y su enquistamiento; (v) ingestión de metacercarias infectivas por el hospedero definitivo y desarrollo a su forma adulta (Fig. 2).

Fig. 1: Esquema del ciclo biológico de *F. hepatica*



A. *F. hepatica* adulta en conductos biliares; B. Huevos en heces; C. Huevo en un medio hídrico; D. Huevo embrionado; E. Miracidio; F. Esporoquiste; G. Redia; H. Caracol huésped intermediario; I. Cercaria; J. Metacercaria; K. infestación por vía oral; L. Metacercaria en tracto digestivo; M. Adolescaria; N. Forma juvenil en migración hepática.

Quiroz, 2003 .

1.3.4.1 Salida de los huevos desde el hospedero definitivo al medio y su desarrollo embrionario

El adulto de *Fasciola hepatica* surge después de 10 a 12 semanas de la ingestión de las metacercarias (Duménigo & Espino, 1999) ,una *Fasciola* adulta vive para perpetuar su especie, liberando por el poro genital un huevo cada 4 segundos hasta 20 mil huevos por día (Llop, *et al.*, 2001), los huevos pasan al duodeno con la bilis (Athías, 1999) , y salen al medio ambiente con la materia fecal (Quiroz, 2003), y un ovino con importante carga parasitaria llega a eliminar entre 2 a 2,5 millones de huevos en materia

fecal al suelo, los huevos pueden permanecer viables hasta por 9 meses dependiendo de las condicionantes del entorno (Sunamo & Ocampo, 2003). Para desarrollarse, los huevos requieren un medio hídrico, como potreros inundables, charcos, canales de curso lento, etc (Euzéby, 2001; Quiroz, 2003) y temperaturas entre 10 y 30 °C (Carrada, 2007; Athías, 1999) y, los huevos eclosionan a miracidios a las 2 ó 3 semanas (Athías, 1999) aunque el grado de maduración del huevo varía dependiendo del hospedador (Cordero del Campillo, 1999), estos no se desarrollan a menores temperaturas de 10°C (Quiroz, 2003). La incubación y eclosión de los huevos de *F. hepatica* es controlada por diversos factores, siendo los más importantes el agua o la humedad, la temperatura, la luz y la salinidad y otros como el oxígeno disuelto, el pH y la carga iónica del agua (Euzéby, 2001).

1.3.4.2 Ruptura de los huevos y salida del miracidio

En el laboratorio a temperatura constante de 26°C y en presencia de luz, la eclosión de miracidios ha ocurrido en 12 días y en oscuridad en 18 días. (Iturbe & Muñiz 2010). La emergencia del miracidio después de la apertura del opérculo del huevo es guiada por el fototropismo positivo, geotropismo negativo y quimiotactismo (Rojo & Ferre, 1999). Los miracidios poseen una forma ovoide y alargada, de unos 130 a 180 micrones de largo (Athías, 1999), posee una papila móvil también llamado órgano perforador (Euzéby, 2001) que mide aproximadamente 128 x 25 nm (Thomas y Leuckart, 1986) y una glándula apical, cuya secreción colabora en la dilución de los tejidos en el proceso de penetración mediante el depósito de enzimas histolíticas (Cordero del Campillo, 1999). Poseen un par de placas fotosensibles en forma de X, llamadas placas oculares o manchas oculares, las cuales son de color marrón, que se encuentran en el tercio anterior del cuerpo, y son un órgano fotoreceptor. (Thomas y Leuckart, 1986). En la parte posterior del miracidio hay células germinales indiferenciadas, que formaran elementos larvales posteriores. (Quiroz, 2003). Los miracidios contienen solamente un intestino rudimentario, y ya que no se alimentan, deben depender completamente para su actividad de las reservas alimenticias endógenas. Estas rara vez duran mas de 24 horas, lo cual limita la búsqueda de un caracol huésped a este periodo de tiempo, después del cual mueren (Cordero del Campillo, *et al*, 1999; Sunamo & Ocampo, 2003), sin embargo la capacidad óptima del

miracidio de *F. hepatica* para invadir a su hospedero intermediario exitosamente es de 1,5 a 2 horas después de su eclosión, después su capacidad declina lentamente. (Ginetsinskaya, 1988). Aunque los miracidios intentan penetrar la superficie del caracol casi ninguno lo logra, la penetración es más exitosa en el área de la cavidad pulmonar, probablemente porque la probóscide del miracidio es más larga que el epitelio de la cavidad pulmonar del caracol. (Ginetsinskaya, 1988) Después de encontrar el caracol, el miracidio se sujeta por su papila apical y toda su parte anterior empezando a tener movimientos rítmicos regulares con contracciones y elongaciones de su cuerpo.

1.3.4.3 Desarrollo y multiplicación dentro del hospedero intermediario.

El miracidio, penetra hasta el hepatopáncreas con acciones histolíticas y mecánicas (Carrada, 2007). La secreción de enzimas proteolíticas de la glándula apical y cuatro glándulas unilaterales durante la migración del miracidio a través de los tejidos del caracol, continúa (Koie *et al.*, 1976). Los tejidos del caracol son disueltos sólo en las proximidades directas de la región apical del miracidio que migra, no es visible el daño del tejido detrás del miracidio. (Dalton, 1999) El miracidio se despoja de sus placas epiteliales durante la migración y se transforma en esporocisto madre de 500 μm (Carrada, 2007) que tiene forma de saco filiforme (Koie *et al.*, 1976). En una temperatura óptima de 18 °C, la metamorfosis toma aproximadamente 12 horas (Ginetsinskaya, 1988). Cuando la penetración del miracidio ocurre en el manto, la madre esporocisto se localiza en la zona alrededor del riñón y corazón del caracol. Si la penetración del miracidio ocurre por el pie, el esporocisto se localiza en el pie, manto o alrededor de la zona entre el riñón y corazón (Dalton, 1999), generalmente en el manto (Carrada, 2007). La madre esporocisto contiene un número fijo de células germinales (Ginetsinskaya, 1988) la glándula apical y las glándulas laterales son visibles en el temprano desarrollo de la madre esporocisto que se reproduce asexualmente por división mitótica a la primera generación de redias, las cuales se liberan por rompimiento de las paredes del cuerpo de la madre esporocisto que inmediatamente muere (Ginetsinskaya, 1988), a partir de su pared se forman de 5 a 10 masas germinativas que se convierten en redias germinales, éstas fuerzan la pared del esporocisto y continúan creciendo en las glándulas intestinales del caracol (Quiroz,

2003). La productividad de la madre esporocisto, medido por el número de redias y el número de cercarias en una redia, es relativo al tamaño de los caracoles infectados (Rondelaud & Barthe, 1987). Cada generación de Redias está compuesta de cohortes por ejemplo: primera, segunda, tercera, etc. (Dalton, 1999). Sin embargo el proceso de poliembrionía suele tener generalmente dos generaciones que duran de 25 a 35 días, regulado por la temperatura ambiental (Carrada, 2007). En promedio, las redias maduras miden 3 mm (Carrada, 2007). Puede ocurrir un periodo de hibernación si las condiciones medioambientales son desfavorables, estando el caracol en diapausa prolongándose el periodo de emergencia de las cercarias (Rojo y Ferre, 1999). Además de la temperatura y la humedad la evolución de la descendencia de *F. hepatica* también tiene relación con el estado de nutrición y edad del caracol que es mejor cuando se encuentra en depósitos acuáticos ricos en algas que en medios secos, fríos y en arroyos claros (Quiroz, 2003). Los trabajos realizados al respecto indican la existencia de hasta cuatro generaciones de redias, siendo las tres primeras bipotenciales: rediógenas y cercariógena (con capacidad de producción de redias y cercarias respectivamente) y la cuarta generación unipotencial cercariógena (Ordoñez, 2009).

1.3.4.4 Emisión de cercarias y formación de metacercarias.

La cercaria de *F. hepatica* es leptocerca (cola simple) y gymnocephala (Nasir, 1988; Fried, 1997), La parte anterior, más ancha y piriforme, remata en el cono bien diferenciado; los dos tercios posteriores forman la cola móvil y granulosa, que remata en una estructura digitiforme (Carrada, 2007), ya existe evidencia de una estructura del tremátodo adulto, como las ventosas y el aparato digestivo, miden de 260 a 340 por 200 a 270 μm , sin considerar la cola propulsora que mide 600 μm de longitud (Carrada, 2007; Quiroz, 2003). Las cercarias de *F. hepatica* que salen de la redia no están aun maduras por lo que entran al hemocele del caracol (Ginetsinskaya, 1988) para acumular glicógeno de este tejido (Dalton, 1999). Las cercarias emergen después de que el proceso de acumulación de glicógeno se completa en 11 días (Ginetsinskaya, 1988). Las cercarias abandonan a las redias a partir de su apertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio (Quiroz, 2003). La intensidad de la liberación de cercarias depende de la cantidad de glicógeno en los tejidos del caracol. La emergencia de cercarias está influenciada por factores ambientales. La óptima temperatura para la emergencia de

cercarias coincide con la temperatura que necesitan los caracoles para su óptima actividad; condiciones ambientales adversas inhiben el desarrollo del parásito y también la actividad de los caracoles. (Dalton, 1999) El número de cercarias liberadas diariamente depende de la edad y número de redias (carga de redias, = intensidad de infección), y el número de miracidios que infecta al caracol (Lee *et al.*, 1995). Regularmente, las cercarias emergen entre los 38 a 45 días según Becerril (2004), después de 42 a 56 días de infección según Quiroz (2003), y según Lee *et al.* (1995) la emergencia de cercarias puede ocurrir a los 27 días post-infección. El número de cercarias liberadas diariamente (ritmo diario) no tiene una distribución uniforme durante el día. La periodicidad de la liberación de cercarias está controlada por la sucesión de temperaturas del día y la noche y el fotoperiodo (Ginetsinskaya, 1988). El mantenimiento de caracoles infectados en oscuridad total o en luz continua resulta la interrupción del ritmo diario y la periodicidad de la liberación de cercarias. (Dalton, 1999). Durante el verano, es frecuentemente observado una masa de cercarias emergentes, 1 – 2 h antes de que en caracol muera (Ginetsinskaya, 1988).

Las cercarias originadas a partir de un miracidio pueden llegar a 600 según Quiroz (2003), entre 500 a 650 según Becerril & Romero (2004) y por caracol entre 100 a 4000, siendo el número frecuente 100 (Becerril & Romero, 2004). Las cercarias liberadas por los caracoles se dirigen rápidamente a la superficie del agua (Nasir, 1988), presentan fototactismo positivo y geotactismo negativo (Ginetsinskaya, 1988). Consecuentemente, las cercarias emergen de los caracoles infectados durante días soleados en la superficie de charcos de agua. El brillo del sol acelera el enquistamiento de la cercaria, y la luz difusa retarda este proceso (Dalton, 1999) Aunque según Becerril y Romero (2004) las cercarias presentan fototropismo negativo, por lo que generalmente emergen a partir de las últimas horas de la tarde tiempo en el que nadan activamente. Sin embargo en oscuridad las cercarias no enquistan pero pueden continuar nadando hasta acabar con sus reservas de glucógeno (Aproximadamente 25 h) después del cual muere (Ginetsinskaya, 1988). La mayoría del glucógeno de la cercaria es acumulada en su cola y es la que se utiliza primero (Dalton, 1999). El movimiento de las cercarias es muy activo pero disminuye su intensidad conforme decrece sus niveles de glucógeno y grasa (Ginetsinskaya, 1988). El tiempo de vida de la cercaria está determinado por la cantidad de sus reservas de glucógeno y grasas, temperatura, condición fisiológica de su

hospedador intermediario y la concentración de oxígeno en el agua (Ginetsinskaya, 1988). Las cercarias son aeróbicas, bajas concentraciones de oxígeno en el agua son letales (Dalton, 1999). Las cercarias se enquistan envolviéndose en una cubierta polimérica de quinonas y otras sustancias mucilaginosas (Carrada, 2007), usando secreciones de sus glándulas cistógenas (Fried, 1997) en vegetales como el berro o en el agua donde pierden la cola y se transforman en metacercarias, forma infectante para el vertebrado susceptible, que a las 24 horas de haber enquistado, es infectiva y puede resistir hasta un año en buenas condiciones de humedad y temperatura (Alcaino & Apt, 1989; Ginetsinskaya, 1988) por que son muy sensibles a la desecación y temperaturas altas, pero soportan temperaturas bajas, posibilitando así la supervivencia invernal. Las fases larvianas hibernan junto con los caracoles, fenómeno de gran interés epidemiológico (Carrada, 2007).

1.3.4.5 Ingestión del estadio infectivo y desarrollo hasta el estadio adulto

Los rumiantes se infectan durante el pastoreo; sin embargo, es factible también en los animales estabulados al beber el agua contaminada, o al comer hierbas, heno y ensilados mal realizados. Las metacercarias se desenquistan en el tubo digestivo por acción de la bilis y otros jugos digestivos, dando salida a una adolescaria, capaz de atravesar la pared intestinal y 3 horas después está en la cavidad peritoneal, donde permanece 3 a 16 días (Alcaíno y Apt, 1989) posteriormente reptar por el peritoneo, penetrar la cápsula de Glisson y comienza la migración dentro del parénquima hepático, durante 6 a 7 semanas (periodo migratorio agudo) (Alcaíno y Apt, 1989). La intensidad de los síntomas y signos está condicionada por la magnitud de la carga parasitaria, pueden desarrollar una hepatitis hemorrágica y necrotizante con o sin hemoperitoneo, incluso mortal. Más tarde, el parásito se aloja dentro de los conductos biliares, generando esclerosis y dilatación, e incluso a veces obstrucción aguda del colédoco y síndrome de obstrucción biliar icterico (periodo biliar crónico) (Carrada, 2007). Pudiendo alcanzar una longevidad de 11 años (Botero & Restrepo, 2004). De modo excepcional, algunas fasciolas inmaduras se desplazarán hacia los pulmones, el tejido subcutáneo, los ganglios linfáticos o el útero.

1.4 Limneidos

1.4.1 Descripción

Son moluscos gasterópodos pulmonados, algunos originario del Perú, otros introducidos, ciertas especies consideradas agentes etiológicos de la fasciolosis (Larrea, *et al.* 2007), viven en las orillas de riachuelos, abrevaderos, charcas, praderas inundadas, etc., es decir, donde hay agua dulce de corriente lenta, poseen un potencial sorprendente: un solo individuo suele producir hasta 25,000 caracoles nuevos, en sólo tres meses, principalmente cuando la temperatura es cercana a 22 °C, con humedad adecuada (Carrada, 2007). En épocas secas, pueden estivar, pero las fuentes, abrevaderos y, sobre todo, los regadíos, mantienen altas concentraciones. (Carrada, 2007).

La distribución de la fasciolosis depende de la presencia de un caracol limneido (Rodríguez *et al.*, 1987) que sirve de hospedador intermediario (Wilford, 1977). En Cusco se ha reportado la identificación de *Lymnaea viatrix*, en estudios realizados en la provincia del Cusco y Urubamba (Larrea, *et al.* 1993).

1.4.2 Posición taxonómica

Reino: Animal

Phylum: Mollusca

Clase: Gasteropoda

Subclase: Pulmonata

Orden: Basommatophora

Familia: Lymnaeidae

Especies locales:

1. *Lymnaea viatrix* Orbigny 1835, Sinos.: *Lymnaea viator* (Pilsbury 1911) y *Fosaria viatrix* (Malek 1985).

2. *Lymnaea neotropica* (Bargues *et al.* 2007).

Especies introducidas:

3. *Lymnaea columella* Say 1817, Sino.: *Pseudosuccinea columella* (Baker, 1908).

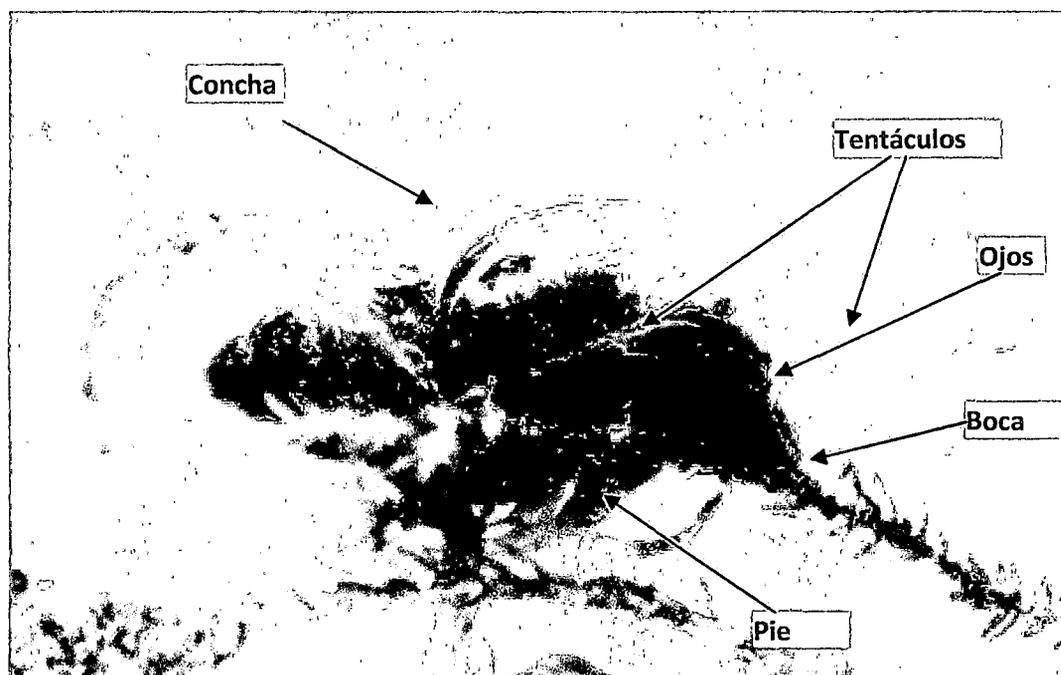
4. *Galba truncatula* Müller, 1774, Sinos.: *Lymnaea truncatula* Müller, 1774 y *Lymnaea (Galba) truncatula* (Abrous *et al.*, 1999).

(Pointier, 2011)

1.4.3 Morfología externa

Los limneidos presentan una concha de carbonato cálcico helicoidal, ovalada, oblonga, de contornos cónicos; la cual se enrolla en el plano vertical y hacia la derecha durante su desarrollo ontogénico, siendo por lo tanto dextrógira (Wildford, 1977); muy asimétrica con respecto al eje vertical, de 6 mm a 10 mm de longitud por 4,8 mm de ancho (Storer, *et al.*, 2003), con 6 vueltas en espira ligeramente redondeadas, presentan peristoma simple y carecen de opérculo (Malek & Cheng, 1974). Presentan un único par de tentáculos en cuya base ancha, triangular y aplanada, se ubican sus ojos (Storer, *et al.*, 2003). Tienen el cuerpo blando e insegmentado, formado por una cabeza anterior, un pie ventral y una masa visceral dorsal (Fig. 3). El cuerpo esta rodeado por un manto fino y carnoso, que es una excrecencia de la pared del cuerpo (Storer, *et al.*, 2003). Poseen una rádula constituye su principal órgano para capturar el alimento, de importancia en taxonomía. En el lado derecho se abre el poro genital, cerca de la cabeza, y el pequeño poro excretor y el poro respiratorio, que es mayor.

Fig. 2 Anatomía externa de un limneido



Pointier, 2011

1.4.4 Morfología interna

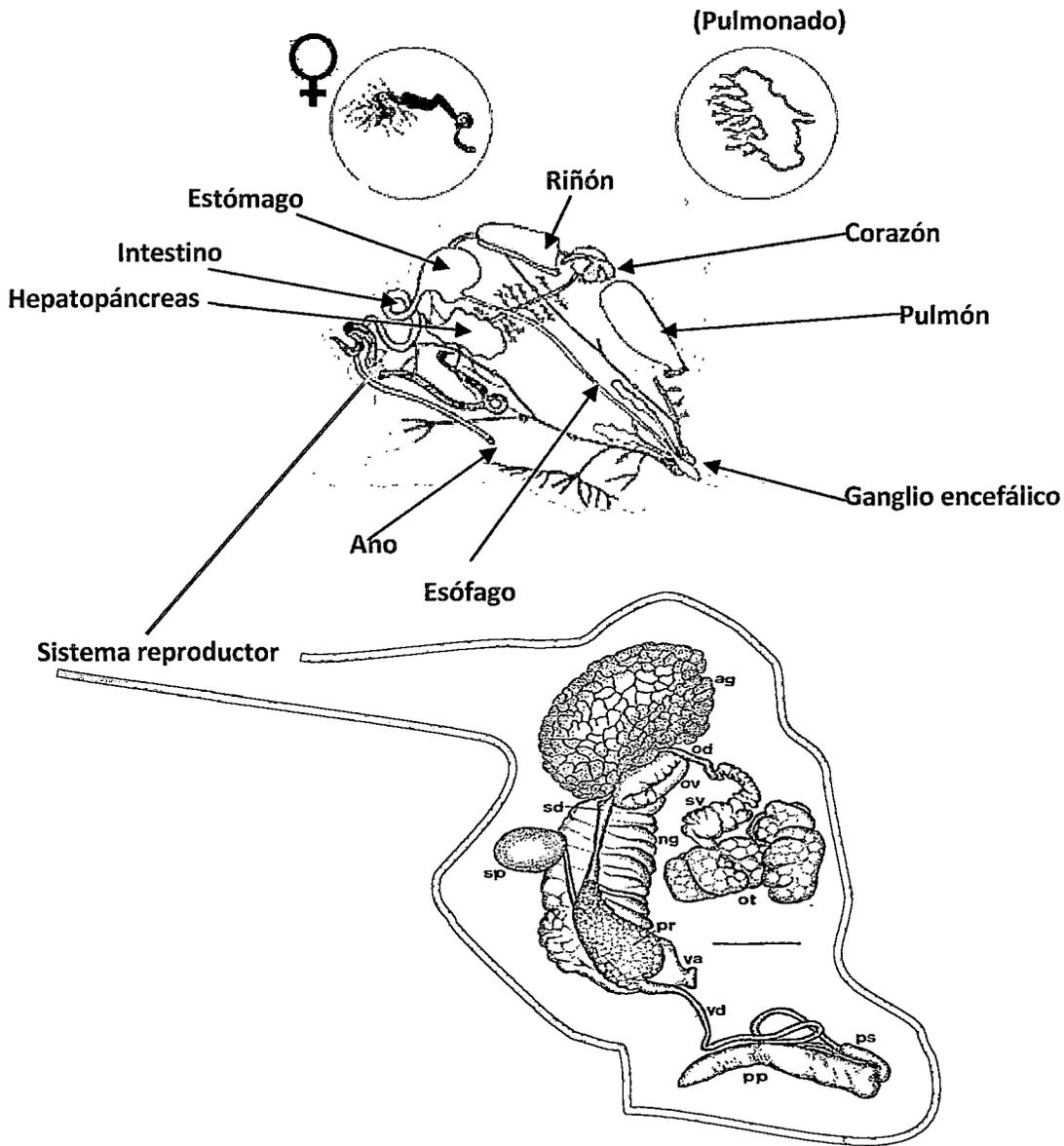
El manto es una membrana delgada que secreta y tapiza la concha y rodea al viceropodio o cavidad del manto, que están dentro de ella. Todas las partes blandas pueden retraerse completamente dentro de la concha por la acción del músculo columelar, que se extiende interiormente hasta la espira superior de la concha (Storer, *et al.*, 2003).

El sistema digestivo comprende: una boca; una faringe muscular con una mandíbula córnea dorsal y una rádula ventral; un esófago alargado; un gran buche de paredes finas; un estómago redondeado; un largo intestino replegado, y el ano. Dos glándulas salivales planas, próximas al buche, envían conductos a la faringe, y una glándula digestiva bilobulada, situada en la parte alta de la concha, desemboca en el estómago (Storer, *et al.*, 2003).

Tienen un pulmón que está formado por una red de vasos sanguíneos situada en la pared externa del manto, en la gran cavidad del manto, dentro de la concha; el aire entra y sale por el poro respiratorio. La sangre recogida en el cuerpo se oxigena en el pulmón y luego es impelida por el corazón, mediante las arterias, a la cabeza, pie y vísceras. El corazón tiene una aurícula y un ventrículo. Un solo riñón filtra en la cavidad pericárdica que rodea el corazón y descarga en la cavidad del manto. Los ganglios nerviosos están concentrados, el par cerebral ocupa una posición dorsal respecto a la faringe, y los pares bucal, pedio y visceral están inmediatamente debajo; nervios procedentes de los ganglios se dirigen a todos los órganos. En cada individuo hay un sistema reproductor mixto, masculino y femenino. Hacia la parte superior de la concha está el ovotestículo, que produce óvulos y espermatozoides. Un conducto hermafrodita comunica con la glándula del albumen del sistema femenino. Un vaso deferente alargado conduce los espermatozoides hasta el pene, que está situado en un saco junto al atrio genital común; el largo flagelo, unido al saco del pene, forma probablemente el espermatoforo (paquete de espermatozoides) dentro del cual los espermatozoides son transferidos en el acto de la copula. El oviducto (mayor que el vaso deferente) va de la glándula del albumen a la vagina, la cual, a su vez, se comunica con el atrio genital. El largo conducto del receptáculo seminal, la glándula mucosa y el saco del dardo están conectados con la vagina (Storer, *et al.*, 2003).

Los limneidos son ovíparos y depositan sus huevos envueltos en una masa ovigera que tiene forma esférica y es de consistencia coloidal; contiene en promedio 12 huevos de 0,77x 0,65 mm; la duración del desarrollo embrionario es de 9 días en promedio (Rodríguez *et al* ,1987).

Fig. 3 Anatomía interna de un limneido



Aparato reproductor de un limneido vista ventral: **ag**: glándula del albumen; **sv**: vesícula seminal; **ov**: oviducto; **ng**: glándula nidamental; **sp**: espermateca; **va**: vagina, **ot**: ovotestis; **ps**: vaina del pene; **pp**: prepucio; **vd**: vaso defrente; **pr**: próstata. (Pointier, 2011)

1.4.5 Efectos patógenos de las larvas de *F. hepatica* en el caracol

Las larvas de *F. hepatica* dentro del caracol implican cambios histopatológicos que interrumpen el normal desarrollo de los caracoles: (i) Los moluscos infectados liberar hasta tres veces más calor que los no infectados; (ii) El consumo de oxígeno aumenta; (iii) Se intensifica el metabolismo; y (iv) incrementa el tamaño del caracol (gigantismo) (Wilson and Denison, 1980; Ginetsinskaya, 1988; Dalton, 1999). Incrementa el metabolismo a causa de las reservas de glicógeno en las glándulas digestivas y musculares del pie de el caracol se reducen. El incremento en tamaño y biomasa del caracol infectado con *F. hepatica* coincide con la migración del esporocisto a través de los tejidos (Thompson, 1997; Dalton, 1999). Después de la infección el tamaño del cuerpo del caracol (incluye tejidos, concha y parásitos) es aproximadamente el doble de los caracoles no infectados en *L. truncatula* (Wilson & Denison, 1980; Dalton, 1999).

Las larvas de *F. hepatica* destruyen el tejido conectivo y de las glándulas digestivas (Preveraud-Sindou *et al.*, 1994). La presión de las larvas en los tejidos causa la desaparición de la luz de los túbulos. (Ginetsinskaya, 1988). En consecuencia, la hemolinfa rica en oxígeno no llega a la glándula, resultando la anoxia y subsecuente autólisis de la glándula digestiva. Esto, junto a la acumulación de metabolitos de la larva, induce a la desintegración de la glándula digestiva y una substancial disminución del nivel del glicógeno (Thompson, 1997).

La castración parasítica puede ser por la total destrucción del sistema reproductivo o fisiológico por ejemplo asociado con una atrofia temporal de glándulas reproductivas. En *L. truncatula*, la castración parasítica fue notada al 21 día post infección como resultado del consumo directo de ovoquistes por *F. hepatica* (Wilson and Denison, 1980).

La pérdida de potencial reproductivo, debido a la castración parasitaria es una característica común de la interacción de *F. hepatica* – caracol hospedero (Thompson, 1997). La disminución de número de huevos ovipuestos por el caracol es directamente asociado a la destrucción de sus gónadas. Interesantemente, la biomasa representada por los huevos perdidos está balanceada con el crecimiento de la biomasa del caracol (Thompson, 1997).

1.4.6 Factores ambientales que afectan la transmisión de *F. hepatica* en hospedadores intermediarios.

Son tres: Prevalencia de infección (tasa de infección), intensidad de infección (generación de redias), y emergencia de cercarias; parámetros comúnmente usados en epidemiología y epizoosociología (Roberts & Suhardono, 1996).

La transmisión de *F. hepatica* en caracoles muestra una fuerte estacionalidad, ocurriendo principalmente en primavera (Roberts & Suhardono, 1996). El desarrollo de la larva continúa dentro del caracol si la temperatura es mayor a 10°C. (Quiroz, 2003) El desarrollo de la redia es particularmente acelerado en verano (Ginetsinskaya, 1988). La producción de cercarias es fuertemente afectada por temperaturas bajo las cuales los caracoles no pueden continuar activos durante el periodo pre-patente de infección (Lee *et al.*, 1995).

1.5 *Rattus norvegicus albus* Berkenhout, 1769

1.5.1 Descripción

Es un roedor considerado como biomodelo experimental de laboratorio, por tener la cualidad necesaria para dar respuesta al cuestionamiento de cómo estudiar las enfermedades que afectan al hombre (Olazabal, 1999; Ministerio de la Presidencia – España, 2005), son animales cuya calidad genética y ambiental han sido controlada y asegurada y, por tanto, es capaz de dar una respuesta fiable y reproducible la pregunta de un estudio experimental (Cardozo, *et al.*, 2007). Por ser de fácil manejo y poseer características zootécnicas adecuadas. (Martínez, 2005)

Las ratas de bioterio se caracterizan por no tener buena vista ni capacidad de distinguir colores, pero posee un gran olfato y oído, en la noche son activos y duermen en el día (Sharp & La Regina, 1998), para su alimentación y defensa cuenta con dos filosos incisivos superiores y dos inferiores que crecen durante toda su vida. No puede vomitar, ya que se lo impide un pequeño pliegue en el esófago. Carece de vesícula biliar; el pulmón derecho presenta cuatro lóbulos, mientras que el izquierdo sólo uno (Sharp & La Regina, 1998), tiene cinco pares de glándulas mamarias y unas pequeñas glándulas lagrimales en la parte posterior del globo ocular cuya secreción es rica en

lípidos y porfirinas (Martínez, 2005). Mide entre 8 y 30 cm de longitud entre cabeza y cuerpo. La cola mide entre 8 y 20 cm. Pesan 5 g los recién nacidos, 50 g los destetados y entre 250 y 400 gramos cuando la rata es adulta (Sharp & La Regina, 1998), se diferencian machos y hembras gracias a la observación de la distancia ano-genital, menor en la hembra y a que el macho (Martínez, 2005; Sharp & La Regina, 1998), además de tener un carácter más calmado es de tamaño mucho mayor. La longevidad media es de 2,5 años (Cardozo, *et al.*, 2007). Su principal órgano regulador de la temperatura es la cola, además de salivar profusamente mojándose el cuello y el pecho. La rata tiene aproximadamente cien años de haber sido domesticada (Martínez, 2005). La domesticación es una forma de evolución. En el caso de la rata de laboratorio, los cambios ocurren en el tamaño y el color así como en su comportamiento, como la disminución de agresividad. A diferencia de lo que sucede en la vida silvestre, donde los individuos más agresivos y territoriales son los que copulan con las hembras (Martínez, 2005), en la rata de laboratorio se busca seleccionar a los individuos menos agresivos para su reproducción, aun así, conserva cierta agresividad (Sharp & La Regina, 1998) otros instintos se mantienen prácticamente inalterados: siguen siendo animales de hábitos nocturnos; si se les permite, construyen madrigueras y son grandes exploradores (curiosos y destructivos); ocultan sus heridas o enfermedades con la finalidad de no atraer la atención de sus predadores (Martínez, 2005).

La rata albina fue el primer mamífero en ser domesticado con propósitos científicos, es originaria del este de Asia. Llegó a Europa y a América a principios del siglo XVIII, a través del comercio mercante marítimo, se distribuyó en toda Europa procedente de la Península Nórdica. (Sharp & La Regina, 1998).

1.5.2 Posición taxonómica

Reino: Animal

Phylum: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia

Suborden: Myamorpha

Familia: Muridae

Nombre científico: *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769

(Sharp & La Regina, 1998)

1.5.3 Bioterio de *R. norvegicus*

El cuidado, la utilización apropiada y el trato humanitario de los animales empleados en investigación, requieren de un conocimiento especializado de los ambientes, procesos y procedimientos relacionados con su cuidado (Nail & McKay, 2003), ello también implica el establecimiento de condiciones de infraestructura y ambientes de trabajo propios y específicos. (Cardozo, *et al.*, 2007). Se denomina bioterio al lugar especialmente adecuado, donde se realiza la cría, mantenimiento y experimentación de los animales de laboratorio, con fines de investigación, terapéuticos y/o docentes. Siendo un ambiente de altas calidades de infraestructura donde se alojan animales de calidad genética (Cardozo, *et al.*, 2007) y microbiológica definida (Nail & McKay, 2003), el principal objetivo del bioterio es producir animales de laboratorio en la cantidad necesaria, garantizando siempre, una alta calidad de salud, para satisfacer los requerimientos de los diferentes investigadores, brindando un buen servicio en sus instalaciones (Cardozo, *et al.*, 2007). En el bioterio se vigilan las restricciones de entrada, y el desenvolvimiento del personal dentro de las instalaciones del bioterio (Nail & McKay, 2003), protegiendo el bienestar del personal responsable, animal y ambiente. Además de vigilar las garantías del suministro de alimentos y materiales para el cuidado de los animales. Se supervisa y evalúa de manera detallada la calidad de alimento y bebida que reciban los animales (Nail & McKay, 2003; Sharp & La Regina, 1998). Lleva un libro de registros del bioterio, utilizando medios de identificación en cada animal (Ministerio de la Presidencia – España, 2005) evalúa el bienestar físico y el

comportamiento de los animales (Nail & McKay, 2003) así como su reproducción. El manejo de los animales durante la gestación, parición, lactancia y destete de las crías. Y velar por el cumplimiento de los aspectos éticos en la realización de trabajos experimentales con el uso de animales de laboratorio y el mantenimiento de animales en cautiverio con fines de investigación.

El bioterio cuenta con paredes y pisos recubiertos por material de fácil lavado, resistente a desinfectantes y fáciles de limpiar, y con las siguientes condiciones ambientales controladas: climáticas (temperatura, humedad y ventilación), fisicoquímicos (iluminación, ruido, contaminantes y sanitizantes), habitacionales (forma, tamaño, tipo, población de jaulas), y nutricionales (dietas y agua) (Nail & McKay, 2003; Ministerio de la Presidencia – España, 2005). Las exigencias de temperatura y humedad, son de 20 – 24°C y la humedad relativa del ambiente oscilará entre 55 +/-10 % (Ministerio de la Presidencia – España, 2005) La luz es artificial y provista por tubos fluorescentes con incidencia oblicua, de forma tal que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades similares (Nail & McKay, 2003). Los lechos de las ratas son de materiales absorbentes y esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos (Sharp & La Regina, 1998) como viruta de eucalipto o papel picado.

1.5.4 Principios éticos básicos en la experimentación animal como reactivo biológico

Según Cardozo, *et al.* (2007) son 10 principales:

- a. Los progresos del conocimiento humano son necesarios, especialmente los de la biología, la medicina y los de animales.
- b. El hombre tiene necesidad de utilizar el animal, tanto en su búsqueda del conocimiento como para nutrirse, vestirse y trabajar. De ahí el deber de respetar al animal, entre auxiliar y ser vivo como él.
- c. Toda persona que emplee animales con fines experimentales debe tener presente que ellos están dotados de sensibilidad y memoria y son susceptibles al dolor y al sufrimiento.

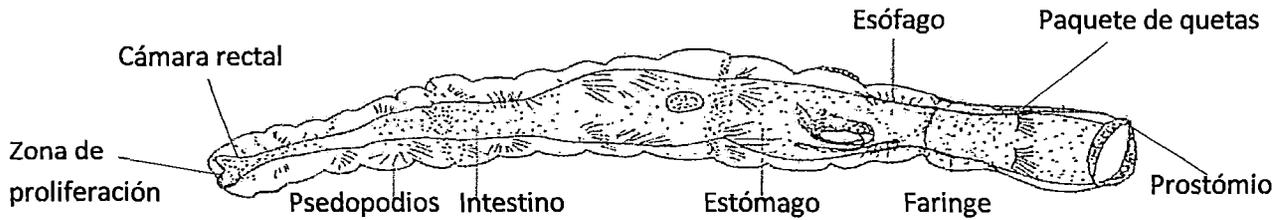
- d. El experimentador es moralmente responsable de sus actos, en el marco de la experimentación animal.
- e. Las experiencias que afecten a los seres vivos y las extracciones de tejidos de sujetos vivos con fines de investigación deben ser realizadas por un científico calificado o bajo su control directo. Las condiciones de mantenimiento de los animales de experimentación deben ser definidas y controladas por un veterinario o un científico competente.
- f. En los ensayos que impliquen el uso de animales debe existir una probabilidad razonable de que estos estudios contribuyan de manera importante a la adquisición de conocimientos que desembocarán, eventualmente, en la mejora de la salud y del bienestar del hombre y de los animales.
- g. Los métodos estadísticos, los modelos matemáticos y los sistemas biológicos in vitro deben ser empleados cuando sirvan para completar la experimentación animal y para reducir el número de sujetos utilizados.
- h. El experimentador deberá utilizar el animal mejor adaptado a su investigación y tener en cuenta los grados sensoriales y psíquicos propios de cada especie. Los animales en peligro de extinción no deberán ser utilizados más que en circunstancias excepcionales bien definidas. Siempre que sea posible, los animales utilizados en el laboratorio provendrán de criaderos especializados que aseguren las mejores condiciones de equilibrio biológico.
- i. El experimentador debe velar para que las condiciones de mantenimiento de animal de laboratorio sean las más adecuadas y para suministrarle los cuidados necesarios antes, durante y después de las intervenciones.
- j. El experimentador tiene el deber de evitar al animal todo sufrimiento físico o psíquico inútil. Debe llevar a cabo los métodos que permitan limitar el sufrimiento y los dolores en el caso en que éstos sean inevitables.

1.6 *Chaetogaster limnaei*

Anélido que se caracteriza por poseer numerosas quetas por haz y en número par en sus segmentos 2, 6, 7 y 8 (Patti, *et al*, 2008), cutícula fina, no quitinosa; tubo digestivo completo; sistema sanguíneo cerrado; nefridios pares; un par de ganglios cerebrales dorsales, conectados con el cordón nervioso ventral, medio y macizo,

provisto de ganglios y nervios laterales en cada somito. Segmentación aparente exterior e interiormente; sin cabeza ni parapodos; monoicos; los gonoporos masculinos se abren sobre el segmento del ovario; un solo par de testículos.; con clitelo que secreta la ooteca para los huevos; sin larvas, desarrollo directo; principalmente en las aguas dulces y en el suelo húmedo. (Storer, *et al.* 2003).

Fig. 04 Anatomía de *C. limnaei*



En base a Storer, *et al.*, 2003

Como casi todos los miembros de la subfamilia Naidinae, especies *Chaetogaster* normalmente se reproducen asexualmente. Ellos por lo tanto formar cadenas características de dos o tres gusanos que se constituyen a través de una forma de brotes. Estas cadenas dan lugar a nuevos individuos. Sin embargo, los gusanos cambian a la reproducción sexual en tiempos difíciles como el invierno. *C. limnaei*, sale de su sede a finales del verano o el otoño, vive y se reproduce sexualmente libremente en el agua durante un tiempo y luego en la primavera, se adhiere a los moluscos huéspedes nuevos.

A diferencia de los demás oligoquetos, *C. limnaei* posee un inusual estilo de vida simbiótico: vive en la cavidad del manto de caracoles pulmonados acuáticos, se alimenta de pequeña y ectosimbiótica fauna, consume varios organismos diminutos como rotíferos, algas, cercarias y miracidios. O vive dentro del tejido renal en caracoles huéspedes que se alimenta de las células renales y larvas de trematodos infectantes. (Gruffyd, 1965)

Estos diferentes estilos de vida permitieron hacer la hipótesis de la existencia de dos diferentes subespecies de *C. limnaei* ocupando dos diferentes nichos en el caracol, teniendo estas diferencias (ecto y endosimbionte) basadas en características morfológicas, dieta y ciclos reproductivos (Gruffyd, 1965). Basado en estas observaciones Gruffyd en 1965 en Inglaterra establece dos subespecies *C. limnaei limnaei* para la forma ectosimbiótica y *C. limnaei vaghini* para la forma endosimbiótica o parasítica (Patti, *et al.*, 2008).

1.6.1 Posición taxonómica

Phylum: Annelida

Clase: Oligochaeta

Orden: Clitellata

Familia: Tubificidae

Subfamilia: Naidinae

Género: Chaetogaster

Especie: *Chaetogaster limnaei* (Von Baer, 1827)

Storer, *et al*, 2003

1.7 Definición de algunos términos

1.7.1 Potencial Biótico

El potencial biótico (r) es la capacidad intrínseca de reproducción de cada especie, depende de propiedades fisiológicas genéticamente determinadas (Morlands, 2004), esto significa que resulta de la manifestación del aumento poblacional como consecuencia de los nacimientos que se producirían si todos los organismos o todas las hembras, según sea el caso se reprodujeran, sin que hubiera procesos como muertes o desplazamientos ni carencias ni presiones que pudieran alterar la natalidad de la población, es decir cuando el medio provee agua, alimentos, clima adecuado y ausencia de poblaciones con efectos negativos.

Por lo que el potencial biótico de una especie no es constante sino que varía en función de las condiciones del medio, los que resultan afectadas por el incremento poblacional. (Morlands, 2004), de todos modos tiene interés conocer el potencial biótico máximo o potencial (obtenido en condiciones ideales de laboratorio) pues al compararlo con el potencial biótico real (obtenido a campo, en condiciones naturales) se logra una estimación de la resistencia ambiental.

1.7.2 Potencia invasiva

Se caracteriza por el número de adultos de *F. hepatica* localizados en el parénquima y en los conductos hepáticos encontrados, comparados con el número de metacercarias inoculadas en cada hospedero (Olazabal *et al.*, 1999; Ordoñez, 2009)

1.7.3 Extensión de la invasión

Es el porcentaje obtenido al comparar la cantidad de hospedadores encontrados parasitados en una necropsia con la cantidad de animales inoculados por grupo. (Olazabal *et al.*, 1999)

1.7.4 Control natural

Es la utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por organismos nocivos. Desde este punto de vista se incluyen en este concepto no solo los parasitoides, depredadores y patógenos de insectos y ácaros, sino también el de fitófagos y patógenos de malezas así como feromonas, hormonas juveniles, técnicas autocidas y manipulaciones genéticas. (Organización Internacional de Lucha Biológica OILB, en www.lobc-global.org)

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área geográfica de estudio:

- Fase de campo:

En la presente investigación se colectaron las muestras de caracoles para estudio los meses de diciembre del 2010 a abril del 2011 de cursos de agua intico previamente seleccionados; la primera ubicada por GPS a los 13° 32' 21.9'' latitud sur, 71° 52' 15,6'' latitud oeste y 3324 m de altitud (+/- 8m de error) en el arroyo llamado Rumitabla que transcurre desde un reservorio de agua para riego, a través de una arboleda de eucaliptos del sector denominado Huayllapampa, ubicado en el distrito de San Jerónimo (Fig.5) de la provincia del Cusco, área que forma parte de la ciudad de Cusco suburbano; la segunda (que contenía a *C. limnaei*) ubicada según GPS a los 13° 28' 51.0'' latitud sur, 72° 16' 44,9'' latitud oeste y 3268 m de altitud (+/- 8m de error) en el sector denominado La Joya, cerca de las orillas del río Pitumayo, entre el puente La Joya y una cancha de fútbol (provisional) de la comunidad de Katañiray (Fig. 6) del distrito de Ancahuasi en la provincia de Anta, a 38 Km de la ciudad del Cusco en la ruta hacia Abancay. (Fig. 5); las muestras de vesícula y conductos biliar procedieron del Camal Municipal de San Jerónimo Calle Sorama N° 43 del distrito de San Jerónimo.

- Fase de laboratorio:

Se realizó en el Bioterio de la Facultad de Medicina Humana MH 113-2 y MH 113-3, y en el Laboratorio de Parasitología C-224 de la Facultad de Ciencias Biológicas; situados en la Ciudad Universitaria de Perayoc, Av. de la Cultura 733

Fig. 5 Mapa de ubicación del área de estudio:



2.2 Materiales:

🌿 Material biológico

- Caracoles limneidos
- Contenido de la vesícula y conducto biliar de hígados de 3 ovinos infectados con *F. hepatica*
- Huevos de *F. hepatica*
- Miracidios de *F. hepatica*
- Esporocistos de *F. hepatica*
- Redias de *F. hepatica*
- Cercarias de *F. hepatica*
- Metacercarias de *F. hepatica*
- Ratas de laboratorio *Rattus norvegicus* albus, raza Holtzmann
- Anélidos de la especie *Chaetogaster limnaei*

🌿 Aparatos y equipos

- Incubadora
- Microscopio estereoscópico Labomet CZ M6
- Microscopio biológico de campo claro trinocular Olympus CX31
- Cámara fotográfica digital Cannon
- Calefactor de aceite Focus 2000 CATA
- Termohigrómetro digital Radiochack
- Ventilador 400K COOPER
- Autoclave semiautomática BOEKEL
- Balanza digital
- Hervidor de agua eléctrico
- Cocinilla eléctrica

🌿 Material de vidrio

- Placas petri
- Probeta de 1000 mL
- Matraz erlenmeyer de 250 mL

- Varilla de vidrio
- Tubos de ensayo con escala volumétrica de 10 mL
- Tubos de ensayo con tapa de 12 mL
- Embudo de cristal
- Pipetas de 1 mL 1/100, 5 mL 1/10 y 10 mL 1/10
- Láminas porta y cubre objetos
- Desecador de cierre hermético

🐾 Material auxiliar

- Cadena de 6 acuarios, (de 20 x 40 x 25 cm, cada uno)
- 2 Jaulas para rata de 30 x 60 x 30 cm
- Jaula para rata de 120 x 20 x 20 cm, con 6 divisiones
- Multiplaca de ELISA con 96 pocillos Num maxisorp
- Jeringa descartable de 1 mL, con aguja de 0,40 mm x 13mm
- Estuche de disección (bisturí enmangado, pinzas de disección, tijeras y agujas de disección)
- Coladeros de 60 hilos/pulgada
- Frascos de boca ancha y tapa rosca
- Copas de sedimentación de 250 mL
- Guantes descartables

🐾 Suplemento alimenticio para caracoles:

- Nitrato de potasio (KNH_3)
- Carbonato de calcio (CaCO_3)

🐾 Soluciones de trabajo

- Agua hervida enfriada
- Agua corriente desclorada
- Safranina 1%
- Azul de metileno 1%
- Cristal violeta 2%
- Solución fisiológica 0,85%

- Cloroformo puro
- Formol al 10%
- Verde de malaquita 5%
- Solución de hipoclorito de sodio al 0,05%
- Alcohol al 96%

☛ Materiales de campo

- GPS GARMÍN
- Material de bioseguridad (guantes descartables, botas de jebe hasta las rodillas)
- Espátula
- Frascos de plástico con cierre hermético
- Pinzas

☛ Otros

- Alimento para caracoles (plántulas de berro, algas)
- Alimento para rata (maíz, pienso para gato, purina, zanahoria, plátano, gelatina sin sabor y leche).
- Comederos y bebederos de cerámica para ratas
- Camas de madera para rata de 12 x 30 x 12 cm
- Viruta de eucalipto
- Bolsas de polipropileno
- Papel milimetrado
- Algodón

2.3 Métodos

2.3.1 Tipo y diseño de investigación

El presente estudio es de tipo descriptivo transversal, y de aplicación mediante DISEÑOS EXPERIMENTALES, manipulando deliberadamente variables en condiciones controladas para imitar el ciclo de *F. hepatica* y su interacción con *C. limnaei* en laboratorio.

2.3.2 Variables de la investigación.

Variable independiente. (Causa)

Ciclo biológico de *F. hepatica* en laboratorio.

Indicadores

- El seguimiento del número de estadios de *F. hepatica* observados en caracoles intermediarios limneidos.
- El seguimiento del número de estadios de *F. hepatica* observados en ratas de bioterio de la especie *R. norvegicus*.

Variables dependientes. (Efecto)

- Estimación del potencial biótico de *F. hepatica*
- Determinación de la potencia invasiva y extensión de la invasión en ratas
- Eficacia de *C. limnaei* como su controlador natural al enfrentarlo a este.

2.3.3 Determinación del tamaño muestral

Se tomó en cuenta un nivel de confianza del 95%, $Z_{\alpha} = 1.96$. Una precisión de 3% (0.03), un valor aproximado de la proporción que queremos medir, de acuerdo a Larrea *et al.*, (2007) el índice de infección experimental de *L. viatrix* por *F. hepatica*, es del 70%.

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

Donde:

- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (ya que la seguridad es del 95%)
- p = proporción esperada (en este caso 70% = 0.7)
- $q = 1 - p$ (en este caso $1 - 0.7 = 0.3$)
- d = precisión (en este caso deseamos un 3%)

Para este caso:

$$n = \frac{0.96^2 * 0.7 * 0.3}{0.03^2} = 215$$

Se consideró 215 caracoles para iniciar la inoculación experimental con miracidios de *F hepatica*.

2.3.4 Colecta de caracoles

La colección de los moluscos se realizó mediante la búsqueda visual sobre el sustrato fijo o flotante de una superficie de recolección de 1 m² fijada, capturando el mayor número de moluscos posibles, haciendo uso de una pinza, tratando de no dañar al caracol y manteniendo el biotopo tan intacto como sea posible. Para estimar la abundancia de caracoles, se utilizó la captura por unidad de esfuerzo (Prepelitchi, 2009), equivalente a 60 minutos de trabajo, contando con elementos de bioseguridad, se buscaron caracoles en las orillas, sobre la superficie (Fig. 7) y en el fondo del fango. El fango, y la tierra seca extraída fueron revisados minuciosamente in situ, en busca de caracoles vivos y/o conchillas vacías. También se buscaron caracoles adheridos a la vegetación circundante, sobre todo se encontraron caracoles en hojas, tallos y raíces de berro (Fig. 6), en piedras y algunas algas. (Las características físico-químicas del agua de los puntos de muestreo se muestran en Anexos 5 y 6).

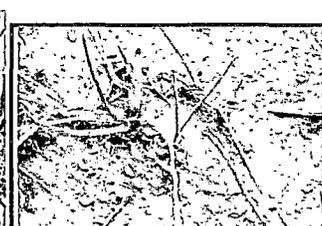


Fig. 6 Búsqueda de caracoles en plántulas de berro Fig. 7 Caracoles en su medio natural

In situ se realizó una primera verificación de los caracoles de concha dextrógira y sus ovisacos (Fig. 8) Los ejemplares fueron colocándolos en recipientes de plástico de cierre hermético con agua del sitio de colecta, rotulados con la fecha y el lugar de muestreo, siendo trasladados vivos al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC, para su observación microscópica (Fig. 9), identificación y mantención.

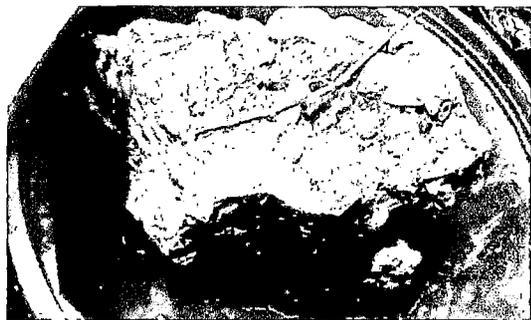


Fig. 8 Colecta de ovisacos de caracoles



Fig. 9 Vista microscópica de ovisacos, 40 X

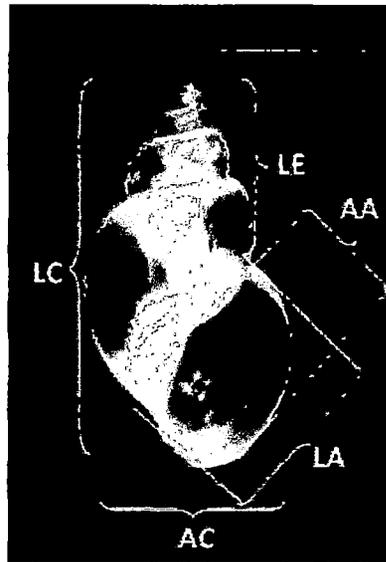
En el laboratorio, se observó que en la población de caracoles provenientes de Katañiray, contenían externamente, entre la concha y el manto, pequeños anélidos que los caracoles colectados de San Jerónimo no poseían.

2.3.5 Reconocimiento del limneidos

La identificación de los caracoles, se basó teniendo en cuenta patrones externos de caracterización. En América del Sur las especies *L. columella*, *L. cubensis* y *L. viatrix* pueden ser identificadas y son diferenciadas a partir de sus características morfológicas (Prepelitchi, 2009). Los caracteres externos de identificación para la familia Lymnaeidae tomados en cuenta fueron la orientación de la concha dextrógira, de forma globosa y sin opérculo (Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, 2006; Pointier, 2011).

Además se tubo en consideración la morfometría de las conchas midiendo sus caracteres conquiológicos: LC=Largo de concha, AC=Ancho de concha, LA=Largo de abertura, AA=Ancho de abertura y LE=Largo de espira (Fig. 10). (Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, 2006). Con tal fin se efectuó la morfometría de 30 cochas provenientes de La Joya, Katañiray (Desde ahora denominados grupo A) y 30 caracoles provenientes de Huayllapampa, San Jerónimo (Desde ahora denominados grupo B), colocadas luego en placa petri forrada externamente con papel milimetrado para examinarlos a estereoscopía y efectuar las mediciones.

Fig. 10 Variables conquiológicas



Figs. 10. En base a Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, 2006 y Pointier, 2011.

Con la medición de estos parámetros se halló un índice canónico, mediante la razón:

$$LC \times AC / LA \times AA$$

Las dimensiones apreciadas en papel milimetrado fueron confrontadas con las dimensiones presentadas por Ueta (1989), presentadas en la siguiente tabla.

Tabla. 2. Medidas en mm de las conchas de *L. columella*, *L. viatrix* y *L. cubensis*, utilizadas como patrón comparativo. Ueta, 1989

Especie	Largo de la concha	Ancho de la concha	Largo de la abertura	Ancho de la abertura	Largo de espira	Índice canónico
<i>L. columella</i>	6,4 ± 1,17	3,7 ± 0,67	4,5 ± 0,89	2,7 ± 0,51	0,6 ± 0,10	1,948
<i>L. viatrix</i>	6,9 ± 0,21	4,2 ± 0,07	3,8 ± 0,09	2,5 ± 0,08	1,5 ± 0,10	3,050
<i>L. cubensis</i>	6,6 ± 0,21	4,2 ± 0,12	4,0 ± 0,15	2,6 ± 0,08	1,0 ± 1,05	2,665

2.3.6 Mantención de los caracoles en laboratorio

Se dispuso de un acuario de vidrio en cadena de 6 divisiones de 20 x 40 x 25 cm, con 3,5 L. de agua, oxigenadores eléctricos y piedras en el interior de cada uno, en los cuales se adicionó agua declorada suplementada con nitrato en una concentración de 0,13 g/L y de calcio a 0,92 g/L como lo indica Sánchez (1995), renovando la cantidad de agua cada 4 días, agregando algas de los géneros *Oscillatoria* (Fig. 11) y *Spirogyra* (Fig. 12) y plántulas de berro (*Nasturtium officinale*) (Fig. 13), que fueron colectados del propio biotopo de los caracoles, considerando que son su alimento en condiciones naturales.

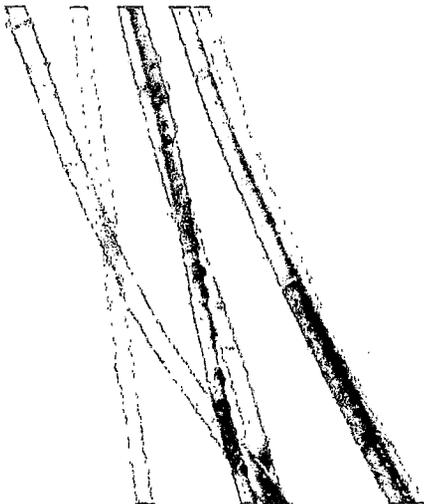


Fig. 11 Algas del genero *Oscillatoria*, vistas en el M. estereoscópico.

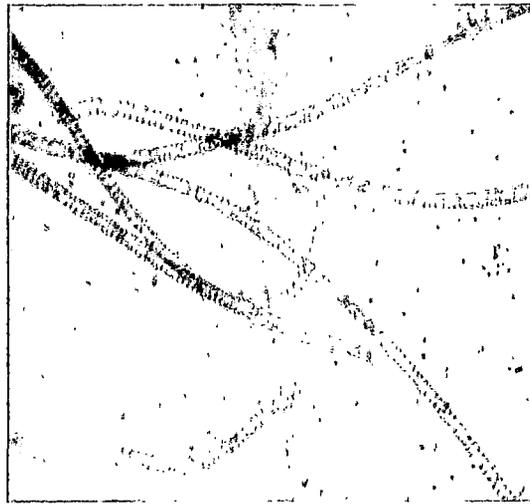


Fig. 12 Algas del genero *Spirogyra*, vistas en el M. estereoscópico.

Los acuarios fueron mantenidos en las condiciones de temperatura y humedad del ambiente del laboratorio, mensurando estas con termo-higrómetro digital (Fig. 14), habiéndose mantenido a una temperatura máxima de 22,7 °C, y mínima de 16,7 °C, humedad relativa promedio de 53%, temperatura en el agua de 16,6 +/- 1°C, disponiendo de iluminación natural que ingresa por las ventanas del laboratorio, con fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, y exposición a 3 horas de luz solar directa. (Las características físico-químicas del agua se muestran en el Anexo 7).

Para el desarrollo y estandarización de la cría de caracoles, se colectaron ovisacos, que fueron cultivados independientemente de los adultos.



Fig. 13 Mantenimiento de caracoles en plántulas de berro y algas

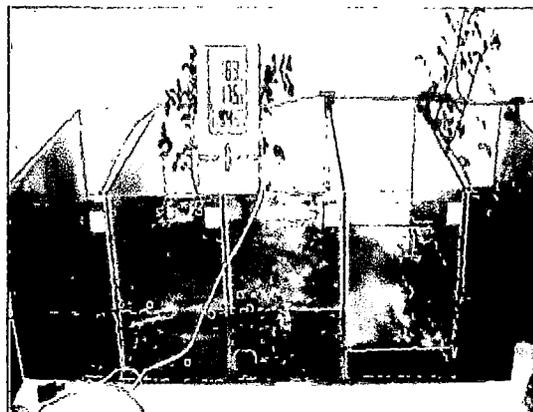


Fig. 14 Control de temperatura y humedad en los acuarios

Distribución de acuarios:

Se dispusieron los acuarios para la mantención de los caracoles de la siguiente manera:

Acuario 1: Caracoles provenientes de San Jerónimo (sin *C. limnaei*)

Acuario 2: Caracoles provenientes de Katañiray (con *C. limnaei*)

Acuario 3: 215 Caracoles provenientes de San Jerónimo con infección inducida por 5 miracidios.

Acuario 4: 30 Caracoles provenientes de San Jerónimo (no colonizados con *C. limnaei*) con infección inducida por 10 miracidios.

Acuario 5: 30 Caracoles provenientes de Katañiray (colonizados con *C. limnaei*) con infección inducida por 10 miracidios.

Acuario 6: Ovisacos

2.3.7 Diseño experimental del ciclo biológico de *F. hepatica*

2.3.7.1 Obtención de miracidios

Se siguió la metodología utilizada por Iturbe y Muñiz (2010), los hígados infectados fueron reconocidos por la presencia de nódulos quísticos que contenían parásitos adultos bañados en un líquido turbio, más o menos hemorrágico que contiene los huevos del parásito como indica Euzéby (2001), colectando los huevos de *F. hepatica* de vesícula y conducto biliar de 3 hígados de ovinos con fasciolosis,

sacrificados en el Camal Municipal de San Jerónimo, durante el mes de enero del 2011. Las muestras hepato-biliares fueron transportadas en frascos de plástico con cierre hermético al laboratorio, donde se tamizaron en 60 hilos por pulgada trasvasando a una probeta de 1000 mL de capacidad (Fig. 15), aforando con 1000 mL de agua hervida fría con un pH = 8,15, conductividad eléctrica = 354,00 uS.cm⁻¹, dureza = 233,60 mg.L⁻¹, de CaCO₃, y cloruros = 14,90 mg.L⁻¹ los cuales fueron valorados en la Unidad de Prestaciones de Servicio de Análisis Químico del Departamento Académico de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco. Se dejó sedimentar por 3 h, se eliminó el sobrenadante, se aforó nuevamente hasta los 1000 mL y se dejó sedimentar nuevamente por 3 h. Se repitió este procedimiento de lavado por 5 a 6 veces, hasta obtener un sedimento lo más claro posible (Valenzuela, 1998). Se colocó 20 mL de este sedimento por placa petri, fueron incubados en presencia de una lámpara eléctrica de 25 watts encendida como fuente de luz constante (Fig. 16). Se mantuvo la temperatura de la incubadora a 26°C, compensando la pérdida hídrica. Las muestras se examinaron diariamente al M. estereoscópico Labomet CZ M6 y al microscopio Olympus CX31 a 56, 160, y 640 X hasta la eclosión de los miracidios.

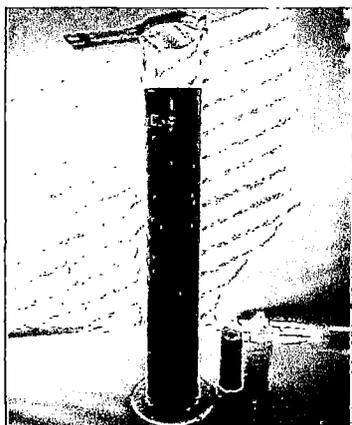


Fig. 15 Sedimentación de huevos de *F. hepatica*

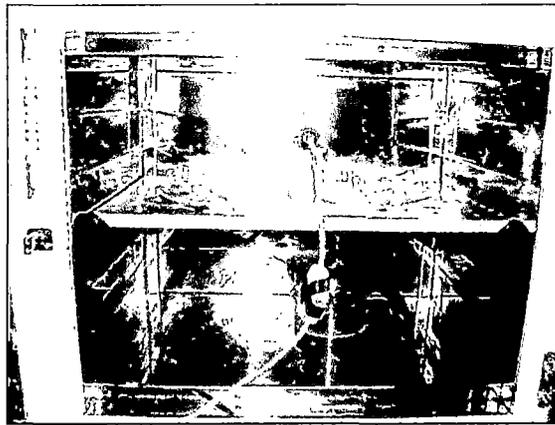


Fig. 16 Incubación de huevos de *F. hepatica*

2.3.7.2 Infección experimental de caracoles con miracidios de *F. hepatica*

A once días de incubación, próximo a la eclosión de miracidios, los huevos de *F. hepatica* embrionados; vistos en el M. estereoscópico y con la ayuda de una jeringa descartable de 1 mL de volumen con aguja de 0,40 mm x 13mm, fueron distribuidos en número de 5 por pocillo Num maxisorp de multiplacas de ELISA (Fig. 17). Observando al día siguiente la eclosión de los miracidios, ya distribuidos en cada pocillo. Los

caracoles a infectar fueron procedentes de Huayllapampa - San Jerónimo (Grupo B) (Acuario 2) debido a no estar colonizados por *C. limnaei*. Para facilitar la infección los caracoles fueron estresados como lo indica Abrous *et al.* (2001), sometiéndolos a agua fría (6°C) por 15 minutos, luego fueron distribuidos individualmente con ayuda de pinzas de disección en cada pocillo Num maxisorp (Fig. 18), que contenía a los miracidios de aproximadamente 1,5 horas de eclosión, tiempo de capacidad óptima del miracidio de *F. hepatica* para invadir a su hospedero intermediario exitosamente de acuerdo a Ginetsinskaya (1988). Observando el ingreso de los miracidios a los caracoles. Después de 2 horas se verificó la ausencia de miracidios en cada pocillo Num maxisorp como signo inequívoco de penetración en los caracoles, que serían mantenidos en un nuevo acuario (acuario 3).

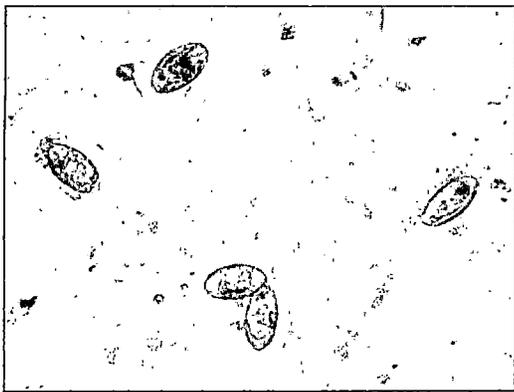


Fig. 17. 5 Huevos embrionados de *F. hepatica*, en pocillo Num maxisorp, 100X.

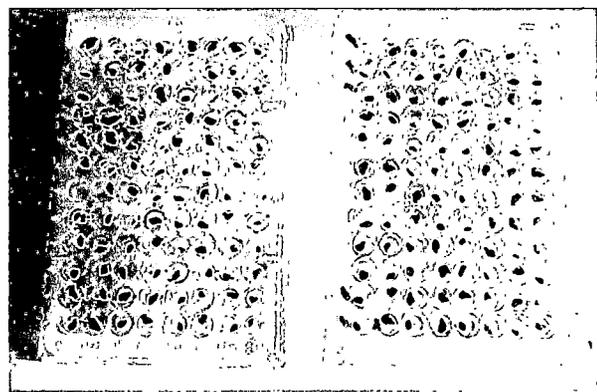


Fig. 18 Inoculación de miracidios de *F. hepatica* en limneidos distribuidos en pocillos Num maxisorp de multiplaca de ELISA

2.3.7.3 Disección de caracoles de infección inducida

Los caracoles inoculados con miracidios de *F. hepatica* (acuario 3), cada tres días, y a la misma hora, fueron diseccionados en grupos de 5, bajo un M. estereoscópico binocular, utilizando el método descrito por Olazabal (1999), que consiste en situar al caracol en una placa petri, añadir 3 ml de agua corriente, comprimir al molusco con una pinza de disección, y con ayuda de agujas de disección observar al M. estereoscópico y microscopio la morfología de esporocistos, redias, cercarias y metacercarias de *F. hepática*, dentro de toda la anatomía interna del caracol, con especial interés en el hepatopáncreas, riñón y gónadas. Durante los primeros días de disección, se confirmó el número de miracidios exitosos en infectar a cada caracol, observando el número de

esporocistos que presenta cada caracol infectado. Posteriormente se observó el desarrollo y multiplicación de los siguientes estados larvales de *F. hepatica*.

2.3.7.4 Obtención de metacercarias

Para la obtención de metacercarias se utilizaron caracoles infectados naturalmente, identificándolos por poseer mayor tamaño (gigantismo) (Wilson & Denison, 1980; Ginetsinskaya, 1988; Dalton, 1998), debido a que durante la migración del esporocisto a través de los tejidos del caracol (al inicio de la infección) induce incremento del tamaño del caracol, aumentando aproximadamente el doble de los caracoles no infectados (Thompson, 1997; Dalton, 1999), teniendo en cuenta que los limneidos colectados provienen de zonas endémicas para fasciolosis, se diseccionó 50 caracoles de cada grupo mediante la técnica de Olazabal (1999), encontrando estadios larvales de *F. hepatica* sólo en caracoles de más de 9 mm de longitud con el 1% de caracoles infectados en el grupo A, y el 2 % de caracoles infectados en el grupo B.

Durante la disección de los caracoles infectados, se observó en el M. estereoscópico el movimiento y la morfología de centenares de redias y cercarias, las cuales fueron apartadas de los restos del caracol con la ayuda de agujas de disección; una hora después, las cercarias iniciaron su metamorfosis a metacercarias, perdiendo su cola y enquistando en la superficie de cada placa petri , éstas se mantuvieron 7 días incubadas en agua a 26°C, en presencia de luz para cerciorar su maduración, viabilidad (Alcaino & Apt, 1989; Ginetsinskaya, 1988) e infección en ratas.

2.3.7.5 Inoculación de metacercarias en *R. norvegicus*

Se empleó el método alternativo para la administración oral en ratas ideada por Dabrowski & Herrero (2008) (Anexo 8) que consiste en la preparación de gomitas de gelatina con leche (Fig. 19) y su administración como vehículo aditivo oral de infección, que es ventajoso por ser económico, práctico, sin stress para el investigador ni animales, y evita lesiones de esófago. Se transfirieron 20 metacercarias del interior de las placas petri donde enquistaron, hacia la superficie de cada gomita (Fig. 21 y 22) manipulando dos agujas de disección, de 0,40 mm de ancho x 13mm de largo y en observación simultánea de 2 M. estereoscópico s (Fig. 20), para luego ser transportadas al bioterio.

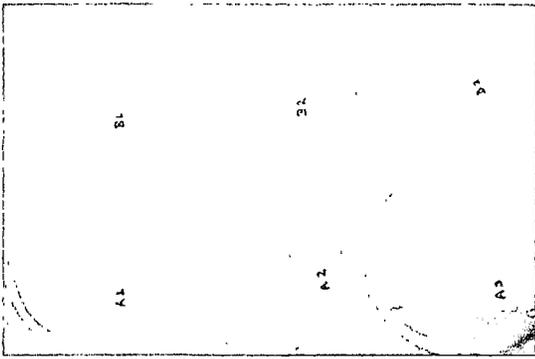


Fig. 19 Gomitas de leche en gelatina

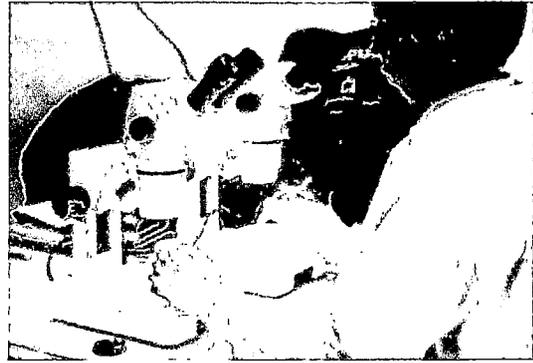


Fig. 20 Transferencia de metacercarias

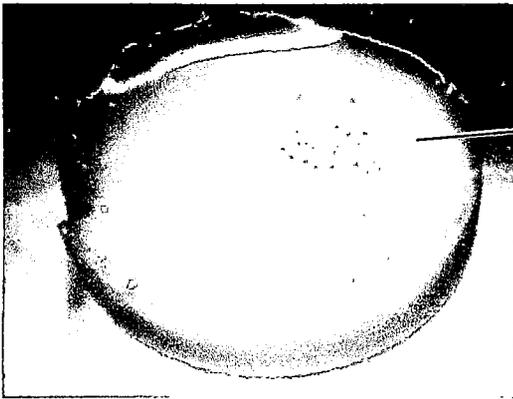


Fig. 21 Gomita con 20 metacercarias

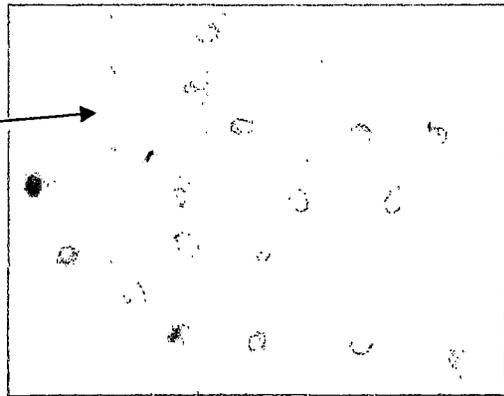


Fig. 22 Metacercarias en la superficie de la gomita, vista en el M. estereoscópico

Previamente en el bioterio, las ratas a infectar fueron pesadas en balanza digital, distribuidas en jaulas individuales (Fig. 23) y mantenidas en ayunas hasta su inoculación, mediante su primer alimento del día (Fig. 24). 6 ratas de la cepa Holtzmann, de sexo masculino, de 32 a 36 g de peso y de 38 días de nacidas, fueron infectadas con una dosis de 20 metacercarias de *F. hepatica* por rata, dicha dosis es indicada por Olazabal, *et al.*, (1999) y Ordoñez, (2009). Confirmándose después de 20 minutos que cada rata terminó completamente su gomita (Fig. 25), ingiriendo asimismo las 20 metacercarias de *F. hepatica* que contenían.

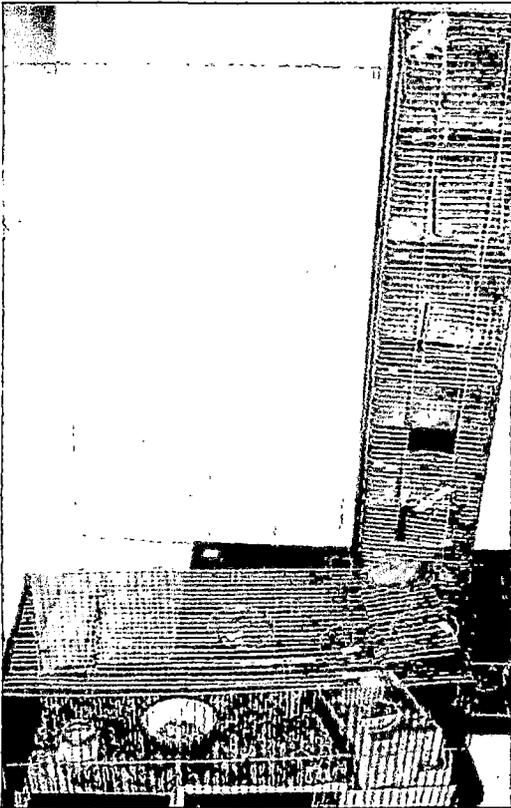


Fig. 23 Disposición de las ratas individualmente



Fig. 24 Predisposición de la rata a infección inducida

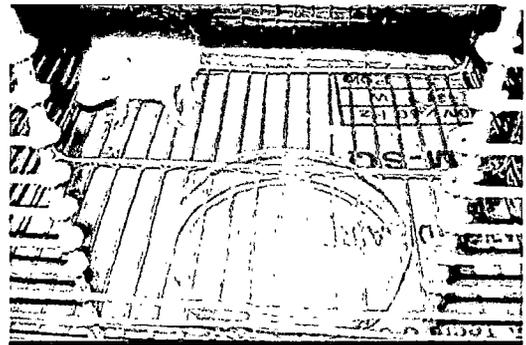


Fig. 25 Confirmación de infección inducida

2.3.7.6 Mantenimiento y cuidado de las ratas

Las ratas inoculadas fueron cuidadas apropiada y humanitariamente en 2 jaulas acondicionada en el bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la UNSAAC (Fig. 26), en condiciones ambientales controladas, a una temperatura regulada por un calefactor de aceite Focus 2000 CATA entre 20 – 24°C, una humedad relativa de 55 +/- 10% medidas por un termohigrómetro digital Radioshack (Ministerio de la presidencia – España, 2005), luz artificial mediante fluorescentes con incidencia oblicua, de forma tal que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades similares (Nail & McKay, 2003), un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, y ventilación adecuada que genera diferencia de presiones entre ambientes. Además los lechos de las ratas fueron acondicionados con viruta de eucalipto esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos (Sharp & La Regina, 1998) la comida que se suministró a las ratas fue maíz, purina y pienso para gatos también esterilizado en autoclave, y la bebida fue agua hervida entibiada. (Sharp & La Regina, 1998). Diariamente se desinfectó todas las superficies de trabajo de los ambientes del bioterio con una solución de hipoclorito de sodio al 0,05%.



Fig. 26 Mantenimiento de ratas infectadas en bioterio

2.3.7.7 Análisis coproparasitoscópico de las ratas

A partir del día 30 post-infección, diariamente, se realizó un análisis cualitativo recolectando las heces de las ratas inoculadas con *F. hepatica* para verificar el día de inicio de la ovoposición de los adultos de *F. hepatica* (periodo prepatente).

Posteriormente se procedió a contar el número de huevos de *F. hepatica* en heces de las 6 ratas. Como la emisión de huevos por individuo muestra fuertes fluctuaciones diarias en murinos (Ordoñez, 2009), se hizo necesario repetir los exámenes por 15 días, y obtener datos cuantitativos fiables, para ello a los 86 días post-infección, las ratas fueron nuevamente distribuidas en jaulas individuales (Fig. 27). Se recolectó el material fecal del día, de cada rata en frascos de plástico de boca ancha (Fig. 28), se transportaron diariamente al Laboratorio de Parasitología, para el análisis coproparasitoscópico se utilizó el método de concentración simple por sedimentación o método de Lumbreras (Anexo 9), especialmente útil para la búsqueda de huevos *F. hepatica* (INS Manual de procedimiento de laboratorio, 2005). Las muestras fecales fueron homogenizadas en tubos de ensayo empleando una varilla de vidrio, y filtradas en coladeros de 60 hilos/pulgada hacia una copa de sedimentación de 250 mL, se dejó sedimentar por 30 minutos, se decantó las 2/3 partes del contenido del vaso y agregó agua hasta llenar el vaso, repitiendo este paso entre 3 ó 4 veces, hasta que el sobrenadante quede limpio (Fig. 29). Se transfirió el sedimento en tubos de ensayo

graduados de 10 mL mediante un embudo de cristal, se dejó sedimentar, y se eliminó el sobrenadante; midiendo los volúmenes de los sedimentos fecales obtenidos (Fig. 30), luego con una pipeta de 1 mL, se transfirieron 0,2 mL de cada sedimento a las láminas porta-objetos, agregando una gota de azul de metileno al 1 % (colorante de fondo) para resaltar los huevos de *F. hepatica* en amarillo dorado, efectuando cada frotis correspondiente, en cada muestra se contaron los huevos de *F. hepatica* observados en la totalidad de la lámina leyendo en el microscopio a 40 X (aumento total). El resto de los sedimentos fueron almacenados en tubos de ensayo con tapa de 12 mL añadiéndoles una gota de formol al 10% para su conservación. Con el número de huevos observados en cada lámina que contenía 0,2 mL de sedimento fecal, se proyectó el número total de huevos de *F. hepatica* contenido en todo el volumen del sedimento fecal obtenido de cada rata durante los 15 días de análisis.

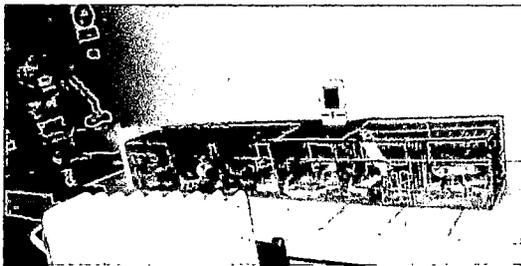


Fig. 27 Distribución de las ratas en jaulas individuales



Fig. 28 Colecta de heces

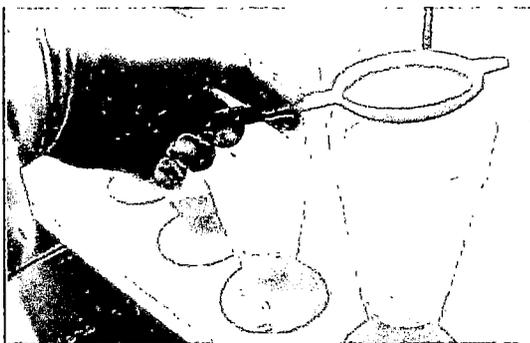


Fig. 29 Método de Lumbreras

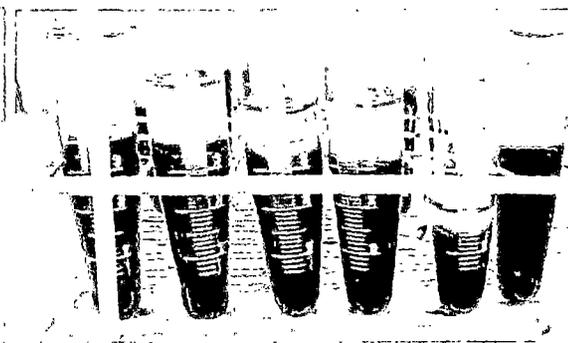


Fig. 30 Medición del sedimento fecal de cada rata

2.3.7.9 Necropsias de las ratas

El sacrificio de las ratas infectadas con *F. hepatica* se llevó a cabo a los 100 días post infección, para ello, las ratas fueron pesadas en balanza analítica y luego transportadas al laboratorio de parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas,

realizándoles una técnica de eutanasia, para lo cual, se embebió un algodón con 2 mL de cloroformo y se colocó en el interior de un desecador de vidrio de tapa hermética donde se indujo a dormir por inhalación al animal (Fig. 31), procediendo a su dislocación cervical. Una vez el animal fallecido se le ubicó en posición cubito dorsal sobre el tablero de disección, se cortó la piel del animal con unas tijeras a lo largo de la línea medio-ventral y se separó cuidadosamente, con la ayuda de pinzas, del tejido muscular subyacente. Después se levantó la pared abdominal con las pinzas y se cortó desde la ingle hasta el apéndice xifoides. De esta forma se retiró la capa muscular para visualizar el conjunto de la cavidad abdominal (Fig. 32).

Dado que en *F. hepatica* el microhábitat de parasitación específico del adulto es el hígado, se realizó un minucioso estudio de este órgano in situ para observar si existen lesiones en el parénquima hepático y si los canales biliares están engrosados, lo que nos indicaría la presencia de adultos en su interior. Luego se aisló el hígado cortando el canal biliar principal a la altura de su unión con el intestino buscando lesiones macroscópicas si las hubiera, pasando luego a estereoscopía constatando que los canales biliares parasitados aumentan mucho su diámetro en la fase de estado, siendo fácil detectar si existen adultos de *F. hepatica* en ellos.

Abriendo el canal con una tijera, los digeneos adultos salieron vivos, procediéndose a su recolección y fijación. Posteriormente se efectuó un lavado con suero fisiológico tanto de la cavidad abdominal como de los distintos órganos para tener la seguridad de la total recuperación de los parásitos, procediendo a su morfometría.



Fig. 31 Relajación en desecador de cierre hermético



Fig. 32 Necropsia de rata

Además se determinó la potencia invasiva (PI) corroborando el número de adultos de *F. hepatica* encontrados y su confrontación con el número de metacercarias inoculadas (20), y la extensión de la invasión (EI) Comparando la cantidad de animales encontrados parasitados en la necropsia con cantidad de animales inoculados en cada grupo.

2.3.8 Identificación de la subespecie de *Chaetogaster limnaei*

Existen dos subespecies de *Chaetogaster limnaei* ocupando dos diferentes nichos en caracoles limneidos (ectosimbionte y endosimbionte). La identificación de subespecie se basó en características morfológicas (Fig. 33) y dieta (Gruffyd, 1965) mostrados a continuación:

1. Ectosimbionte – promedio de número de quetas en 4 segmentos:

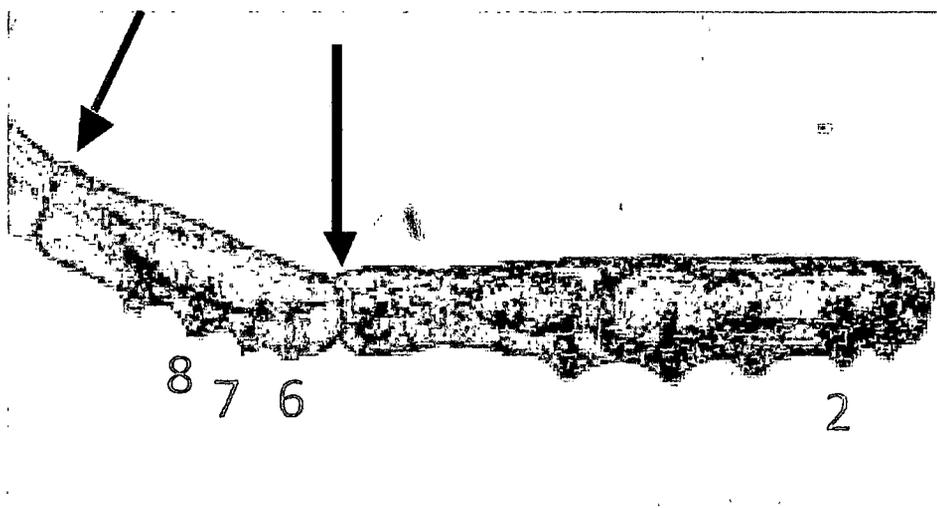
- Segmento 2: 18.7, Segmento 6: 16.3, Segmento 7: 19.2 Segmento 8:20.1
- Contenido intestinal: principalmente diatomeas..... *Chaetogaster limnaei limnaei*

2. Endosimbionte - promedio de número de quetas en 4 segmentos:

- Segmento 2: 12.4, Segmento 6: 12.0, Segmento 7: 13.1, Segmento 8: 12.9
- Contenido intestinal: células renales de caracol. *Chaetogaster limnaei vaghini*

(Patti, *et al.*, 2008)

Fig. 33 Identificación de segmentos de importancia taxonómica en *Chaetogaster limnaei*



Patti, *et al.*, 2008

2.3.9 Estimación de la eficiencia del control natural de *C. limnaei limnaei*

Para medir la eficiencia de *C. limnaei* como controlador natural de *F. hepatica*, se inoculó miracidios en caracoles limneidos, con la técnica anteriormente descrita. Para ello se utilizó dos grupos de caracoles, 30 caracoles colonizados con *C. limnaei*, procedentes de Katañiray (Acuario 2) y 30 caracoles no colonizados con *C. limnaei* procedentes de San Jerónimo (Acuario 1). Los caracoles de ambos grupos fueron inoculados con 10 miracidios, y mantenidos por 40 días (Acuarios 4 y 5 respectivamente), el día 40 post-inoculación se realizó la disección de todos los caracoles con la técnica descrita por Olazabal (1999) para la verificación de la presencia o ausencia de la infección de *F. hepatica* en los tejidos de los caracoles, a través del M. estereoscópico, en búsqueda de sus estadios larvales desarrollados.

2.3.10 Cálculo de miracidios ingeridos por *C. limnaei limnaei*, por unidad de tiempo

Nuevamente se obtuvieron miracidios siguiendo la técnica utilizada por Iturbe y Muñiz (2010), calculando la densidad de miracidios por cm^2 en placa petri, considerando que se obtienen gran número de miracidios de 150 μm de tamaño (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Para ello, se enfocó en un M. estereoscópico la placa petri que contenía a los huevos de *F. hepatica* cercanos a eclosionar, situándola encima de una hoja de papel milimetrado, cuantificando el número de huevos embrionados en 20 campos de 25 mm^2 de área seleccionados al azar (Tabla 3).

Tabla 3. Medición de la densidad de miracidios en placa petri

N. de campo	N. de huevos de <i>F.</i> <i>h.</i> embrionados en 25 mm ²	N. de huevos de <i>F.</i> <i>h.</i> embrionados en 1 cm ²	N. de campo	N. de huevos de <i>F.</i> <i>h.</i> embrionados en 25 mm ²	N. de huevos de <i>F.</i> <i>h.</i> embrionados en 1 cm ²
1	126	504	11	130	520
2	128	512	12	143	572
3	148	592	13	109	436
4	140	560	14	125	500
5	146	584	15	124	496
6	136	544	16	126	504
7	111	444	17	132	528
8	132	528	18	134	536
9	117	468	19	128	512
10	142	568	20	127	508

Los datos de la densidad de miracidios en la placa petri, se muestran en la Tabla 4, en la que se concluye en una variabilidad del 8,14%, considerado el cálculo preciso.

Tabla 4 Resultados de la estadística univariable para determinación de densidad de miracidios por unidad de área.

Número de campos medidos	20
Valor Min. de miracidios	436 miracidios/cm ²
Valor Max. de miracidios	592 miracidios/cm ²
Sumatoria	10416 miracidios/cm ²
Promedio	520,8 miracidios/cm ²
Error estándar	9,47729 miracidios/cm ²
Varianza	1796,38
Desviación estándar	42,3837
Coefficiente de variación	8,1382 %

15 caracoles colonizados con *C. limnaei* fueron distribuidos en 3 grupos de 5 y situados en la placa petri que contenía la población de miracidios de densidad conocida durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente, iniciando simultáneamente esta exposición;

observando que alrededor la abertura de las conchas de los caracoles se situaban los *C. limnaei*, intentando devorar a la mayor cantidad de miracidios que se ubicaban a su alcance. Inmediatamente después de las exposiciones los caracoles fueron diseccionados por la técnica de Olazabal (1999), aislando mediante las agujas de disección, todos los *C. limnaei* que hospedaba cada caracol, y cuantificando el número de miracidios dentro del estómago de cada anélido, mediante microscopía a 100 X de aumento, aprovechando la transparencia de su cuerpo.

2.3.11 Tratamiento estadístico

Para el tratamiento estadístico las mediciones cuantitativas y cualitativas fueron almacenados en una base de datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y analizados por el Paquete Estadístico SPSS 15.0 para Windows, considerando como significativo un $p < 0.05$, para la interpolación de puntos se utilizó el software Curve Expert, versión 1,4.

Para el procesamiento de los datos y el cálculo de valores máximo y mínimo así como las medias desviación estándar, erros estándar y coeficientes de variación, se recurrió al paquete estadístico Microsoft Office Excel 2007; Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los siguientes test estadísticos: Coeficiente de correlación de Pearson, el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, la prueba e homogeneidad Chi cuadrado; y la T de Student para muestras independientes. Dichos análisis se llevaron a cabo con el Paquete Estadístico SPSS 15.0 para Windows, considerando como significativo un $p < 0.05$.

2.3.11.1 Cálculo del potencial biótico de *F. hepatica*

Con la cuantía del número de todos los estadios larvarios de *F. hepatica*, tanto en limneidos y *R. norvegicus*, se estimó la función matemática de crecimiento poblacional que más se ajusta, y mediante el cálculo de la formula exponencial se estimará el potencial biótico “r”.

2.3.11.2 Estimación de la eficiencia de *C. limnaei*, mediante la prueba de Homogeneidad (Chi-cuadrado)

El interés de esta prueba es determinar si la infección de caracoles expuestos a 10 miracidios son significativamente homogéneos en desarrollar la infección de *F. hepatica*. Para esta estimación se pondrán en contacto 10 miracidios en cada uno de 60 caracoles. 30 colonizados con *C. limnaei* y 30 no colonizados. Tomando en consideración un nivel de significancia del 95%. Mediante una tabla de contingencia

2.3.11.3 Estimación del número de miracidios devorados por *C. limnaei* por unidad de tiempo.

Se utilizará una placa de petri conteniendo una población estadísticamente infinita de miracidios de densidad poblacional conocida, en donde se expondrán simultáneamente 15 caracoles, procedentes del grupo A, colonizados con *C. limnaei*, en los siguientes subgrupos:

1. 5 caracoles por 5 minutos
2. 5 caracoles por 10 minutos
3. 5 caracoles por 15 minutos

Para el contraste de hipótesis en las que el número de medias (variables categóricas) a comparar sea superior a dos, utilizamos la prueba del análisis de la varianza (ANOVA). Con la hipótesis siguiente: La capacidad de *C. limnaei* de devorar miracidios de *F. hepatica* no es directamente proporcional a su tiempo de exposición en una población infinita de miracidios durante 5, 10 y 15 minutos.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Colecta de caracoles

En Huayllapampa, San Jerónimo (Grupo B) midiendo el índice de abundancia de captura por unidad de esfuerzo, tuvo una abundancia de 150 caracoles por hora a las 15 horas del día 12 de febrero del 2011, con un total de 400 caracoles colectados; y la colecta en la Joya, Katañiray (Grupo A) tuvo una abundancia de 60 caracoles por hora, a las 15 horas del día 05 de febrero del 2011, colectando un total de 150 caracoles.

3.2 Identificación de la especie de caracol por comparación comprensión

Tomando en cuenta patrones externos de identificación, se observó que ambas poblaciones de caracoles, procedentes de ambos grupos poseen las siguientes características conquiológicas: tipo de concha globosa, sin opérculo de orientación dextrógira. Características semejantes al género *Lymnaea* (Figs. 24 y 25).



Fig. 24 Características conquiológicas y morfometría en mm de caracoles procedentes de Huayllapampa, San Jerónimo, Cusco. Vista en el M. estereoscópico .



Fig. 25 Características conculógicas y morfometría en mm de caracoles procedentes de La Joya, Katañiray, Cusco. Vista en el M. estereoscópico.

Los caracteres conculógicos, LC=Largo de concha, AC=Ancho de concha, LA=Largo de abertura, AA=Ancho de abertura y LE=Largo de espira e índice canónico, medidos de 60 caracoles se expresan en la Tabla 5:

Tabla 5. Morfometría de conchas de caracoles limneidos colectados en Huayllapampa (Grupo B) y La Joya (Grupo A)

Medidas (mm)	Caracoles del Grupo B			Caracoles del Grupo A		
	Media \pm error estándar	Desviación estándar	Rango	Media \pm error estándar	Desviación estándar	Rango
Largo de concha	5,08 \pm 0,14	0,76	3,5 - 7	6,05 \pm 0,19	1,06	3,5 - 8
Ancho de concha	2,85 \pm 0,06	0,34	2,2 - 3,6	3,15 \pm 0,09	0,5	2 - 4
Largo de abertura	2,64 \pm 0,07	0,39	2,1 - 3,8	3,13 \pm 0,11	0,6	2 - 4
Ancho de abertura	1,74 \pm 0,04	0,21	1,4 - 2,3	1,97 \pm 0,06	0,34	1,3 - 2,7
Largo de espira	2,60 \pm 0,07	0,39	2 - 3,3	2,94 \pm 0,12	0,67	1,9 - 4,8
Índice canónico	3,16 \pm 0,06	0,31	2,5 - 3,4	3,15 \pm 0,10	0,54	1,98-4,86

En la cuantificación de los resultados se empleó como medidas de posición la media aritmética y como medidas de dispersión, el error estándar, rango y desviación

estándar. Se compararon los promedios de las medidas morfométricas de los caracoles colectados con medidas morfométricas patrones de ejemplares de colección del Museo Nacional de Brasil (Ueta, 1989), indicado en la Tabla 6.

Tabla. 6. Medidas conquiológicas comparativas en mm de las conchas de *L. columella*, *L. viatrix*, *L. cubensis* (Ueta, 1989) y los caracoles colectados en Huayllapampa (Grupo B) y La Joya (Grupo A)

Especie	Largo de la concha	Ancho de la concha	Largo de abertura	Ancho de abertura	Largo de espira	Índice canónico
<i>L. columella</i>	6,4 ±1,17	3,7 ±0,67	4,5 ±0,89	2,7 ±0,51	0,6 ±0,10	1,948
<i>L. viatrix</i>	6,9 ±0,21	4,2 ±0,07	3,8 ±0,09	2,5 ±0,08	1,5 ±0,10	3,050
<i>L. cubensis</i>	6,6 ±0,21	4,2 ±0,12	4,0 ±0,15	2,6 ±0,08	1,0 ±1,05	2,665
Caracoles del grupo B	5,08±0,14	2,85±0,06	2,64±0,07	1,74±0,04	2,60±0,07	3,16±0,06
Caracoles del grupo A	6,05±0,19	3,15±0,09	3,13±0,11	1,97±0,06	2,94±0,12	3,15±0,10

Para calcular el grado de asociación lineal de los 6 caracteres conquiológicos mostrados en la Tabla 6, se estimó el índice de correlación de Pearson, resultados reflejados en la Tabla 7.

Tabla 7 Coeficientes de correlación entre las medidas de las conchas

	<i>L. columella</i>	<i>L. viatrix</i>	<i>L. cubensis</i>
Caracoles del grupo B	0,666	0,852(*)	0,767
Caracoles del grupo A	0,731	0,879(*)	0,805

* La correlación es significativa al nivel 0,05

Los resultados indican por tanto, que existe evidencia estadística de existencia de semejanza entre las medidas morfométricas de los caracoles procedentes del grupo B, grupo A y las medidas teóricas de *L. viatrix*. Además, mediante la prueba T de student, se comprobó estadísticamente que no existe diferencias significativas entre el índice canónico teórico mostrado de *L. viatrix* = 3,050 (Ueta, 1989) y los índices canónicos de los caracoles de ambas procedencias. A un 95% de confiabilidad, se

obtuvo un valor de $p = 0,0626 > 0,05$ para los caracoles del grupo B; y $p = 0,3179 > 0,05$ para los caracoles del grupo A.

3.3 Mantenimiento de caracoles

Se tuvo los resultados expresados en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de supervivencia de caracoles

	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
Caracoles vivos	163	75,813%
Caracoles hallados muertos	52	24,187%
Total de caracoles	215	100%

El método ejecutado para la crianza de caracoles limneidos, dio un porcentaje de supervivencia para los caracoles inoculados con miracidios de *F. hepatica* del 75, 81 %. Y un porcentaje de mortalidad del 24, 18 %.

3.4 Diseño experimental del ciclo biológico de *F. hepatica*

3.4.1 Obtención de miracidios

Se observó que en presencia de luz, a 26° de temperatura la eclosión de los huevos de *F. hepatica* de procedencia ovina fue de 11 días y 14 horas (278 horas). Observando la eclosión simultánea de los miracidios (Fig. 34), y mediante microscopía de campo claro algunas características anatómicas externas como su forma ovoide, la presencia de cilios alrededor de su cuerpo, su papila móvil y sus placas oculares (Fig. 35), estas larvas fueron pereciendo aproximadamente a las 12 horas después de eclosionar.



Fig. 34 Miracidios recién eclosionados a 100

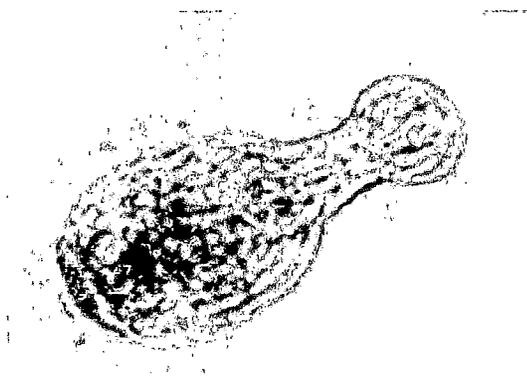


Fig. 35 Miracidio en agua a 640 X.

3.4.2. Infección experimental de caracoles con miracidios de *F. hepatica*

Los 215 caracoles a infectar han sido expuestos individualmente a 5 miracidios de aproximadamente 1,5 horas de eclosión, observando el ingreso de algunos miracidios a los caracoles mediante el Microscopio estereoscópico (Figs. 36 y 37).



Fig. 36 Infección experimental de *F. hepatica* en *Lymnaea viatrix* por el pie, vista al M. estereoscópico.

Fig. 37 Penetración de miracidio en *Lymnaea viatrix*, por el manto vista al M. estereoscópico.

Se evidenció que los miracidios eran guiados mediante su quimiotactismo al aglomerarse alrededor de los caracoles, para luego sujetarse utilizando sus papilas apicales e intentar penetrar al caracol limneido mediante constricciones y elongaciones de su cuerpo.

Tabla 9. Porcentaje de infección experimental de limneidos con miracidios de *F. hepatica*.

	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
Caracoles infectados	117	71,78 %
Caracoles no infectados	46	28,22%
Total de caracoles diseccionados	163	100%

Posteriormente efectuada la infección experimental con 5 miracidios y disección de un total de 163 caracoles, se observó mediante el M. estereoscópico y microscopio biológico de campo claro la presencia de estados larvales de *F. hepatica* en 117 caracoles, indicando el índice de infección experimental inducida en un 71,78 %. Los caracoles que no desarrollaron la infección fueron 46 ejemplares, representando un 28,22%. Indicado en la tabla 9.

3.4.3 Disección de caracoles de infección inducida

El tiempo promedio de la evolución de estadios larvales dentro de los limneidos hasta la formación de cercarias en las condiciones ambientales controladas en el laboratorio, fluctuó hasta los 81 días post-infección. Días en los que se evidenció mediante disección bajo el M. estereoscópico y microscopio biológico de campo claro el desarrollo y multiplicación partenogenética de *F. hepática*.

A los 3 días post-infección, se observó esporocistos en diferentes tejidos del caracol, cuyos tamaños y formas son aún similares al de los miracidios (Fig. 38), otras características en común fácilmente distinguibles en el microscopio fueron la conservación de sus papilas móviles (órgano perforador), placas oculares aun distinguibles y la pérdida parcial de sus cilios (Fig. 39).

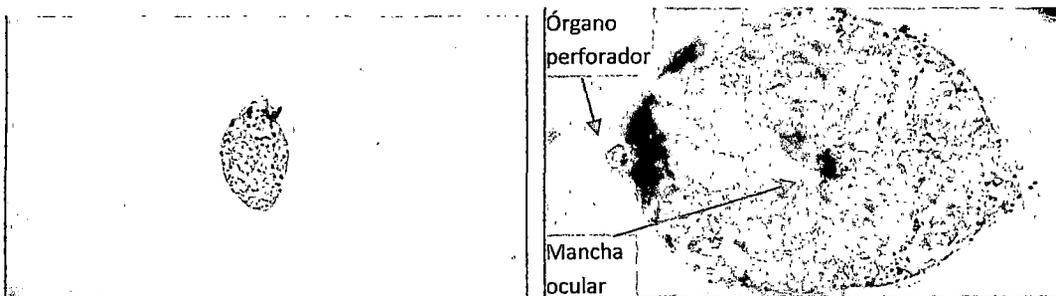


Fig. 38 Esporocisto, 100X

Fig. 39 Esporocisto, 400X

A los 6 días post-infección, los esporocistos fueron observados en el hepatopáncreas del caracol, estos duplicaron su tamaño, todavía presentan escasos cilios aun distinguibles alrededor de su papila, toman formas más circulares, no pudiendo ya distinguírseles sus placas oculares en el microscopio (Figs. 40 y 41).

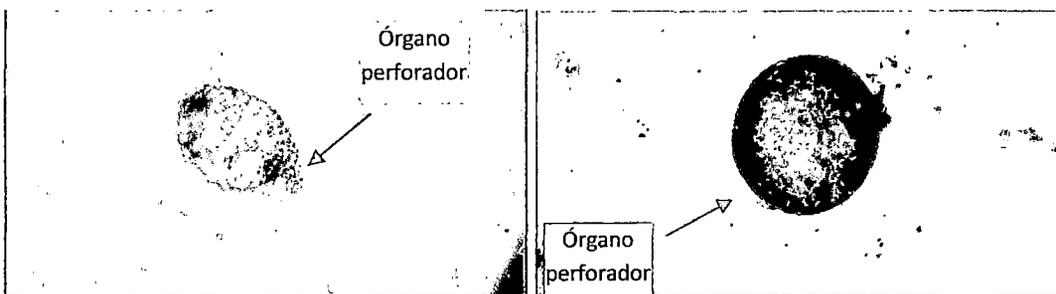


Fig. 40 Esporocisto, 100X

Fig. 41 Esporocisto, en coloración cristal violeta 100X.

A los 9 días post-infección los esporocistos crece un poco más, situados en el hepatopáncreas y/o también en las células renales y corazón del caracol, las células germinales en su interior que darán origen a elementos larvales posteriores empiezan a diferenciarse de mejor manera aumentando de tamaño, todavía conservan y son

distinguibiles sus papilas, pero no sus placas oculares (Fig. 42), sin embargo todavía presentan cilios que poseen movimientos vibratorios en su parte anterior, alrededor de sus papilas (Fig. 43).

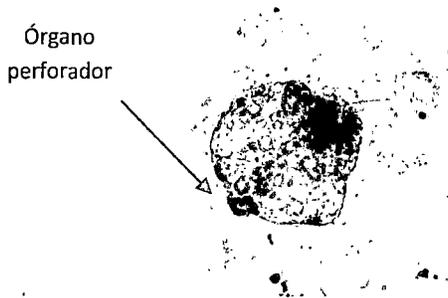


Fig. 42 Esporocisto, 100X



Fig. 43 Parte delantera de esporocisto, 400X

A los 12 días post-infección, se observó que el esporocistos aumenta mucho más su tamaño y se alargan, perdiendo sus cilios completamente y sus órganos perforadores ya no son visibles en el microscopio biológico de campo claro (Fig. 44 y 45).

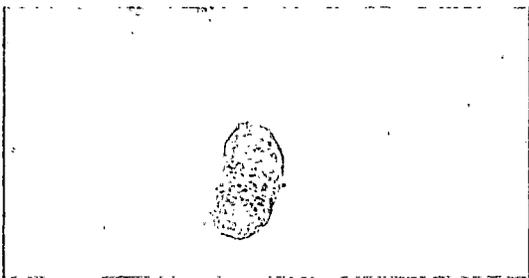


Fig. 44 Esporocisto, 100X.

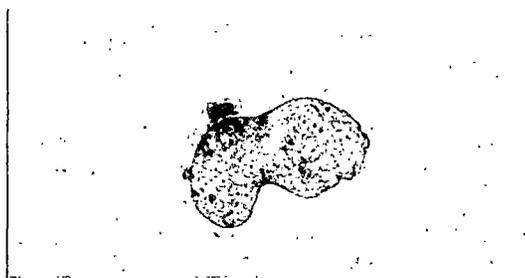


Fig. 45 Esporocisto en safranina ,100X.

A los 15 días post-infección, los esporocistos son maduros, alargados y presentan formas irregulares (Figs. 46 y 47).

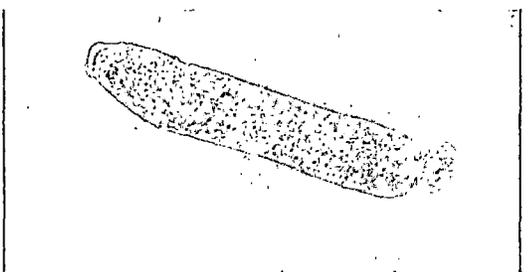


Fig. 46 Esporocisto, 100X.

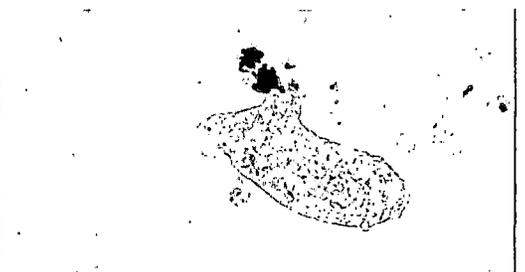


Fig. 47 Esporocisto, 100X.

A los 18 días post-infección se observa que la madres esporocistos origina la primera generación de redías, las cuales se liberan por rompimiento de las paredes del cuerpo de la primera a causa posiblemente de la presión que se ejerce en sus paredes

internamente (Figs. 48 y 49), las redias de primera generación aun no son reconocibles, sólo se observan células germinales libres que inician su diferenciación.

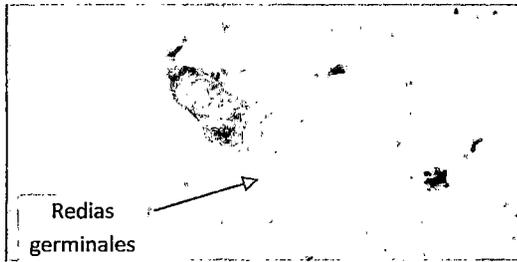


Fig. 48 Madre esporocisto desgarrada, vista en el M. estereoscópico.

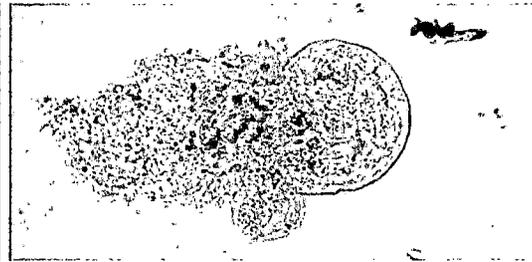


Fig. 49 Esporocisto desgarrado, 400X.

A los 21 días post infección, las células germinales continúan su diferenciación a redias de primera generación fuera de la madre esporocisto, las cuales se distinguen por desarrollar un aparato bucal y un esófago, distinguible por la presencia de dos grandes células reniformes (Figs. 50 y 51).

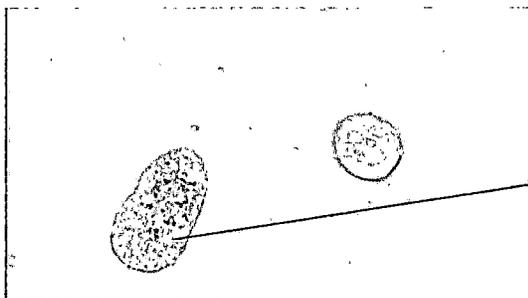


Fig. 50 Redias germinales de *F. hepatica*, 100X.

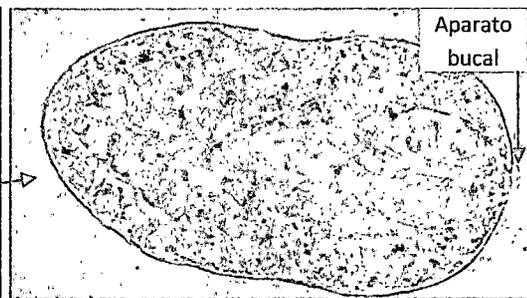


Fig. 51 Redia de *F. hepatica*, 400X.

A los 24 días post infección aun se observa el rompimiento de las paredes de madres esporocistos de tamaño mayor y simultáneamente el crecimiento acelerado del tamaño de redias (Fig. 52) en las células renales del caracol (Figs. 53), que presentan un leve desarrollo de un par de pseudópodos delante y un par de pseudópodos detrás de su cuerpo que les es útil como órganos auxiliares de locomoción.

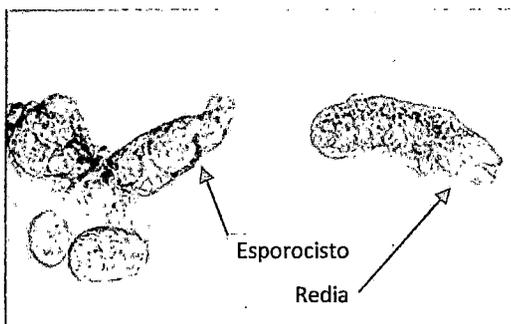


Fig. 52 Esporocisto desgarrado y redia de primera generación, 100X.



Fig. 53 Desarrollo de Redia de *F. hepática* en riñón de *L. viatrix*, 100X.

A los 27 días post-infección las redias de primera generación son distinguibles por su desarrollado aparato bucal y pseudópodos (Figs. 54 y 55).

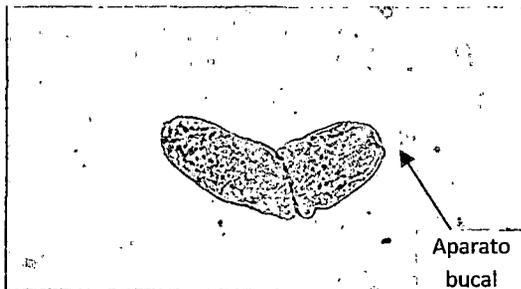


Fig. 54 Redia de *F. hepática*, 100X.

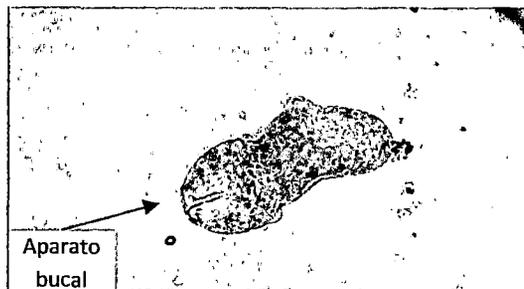


Fig. 55 Redia de *F. hepática*, 100X.

Al día 30 post-infección algunas redias de primera generación se desgarran en sus paredes y liberan a redias de segunda generación que aun son células germinales (Figs. 56 y 57).

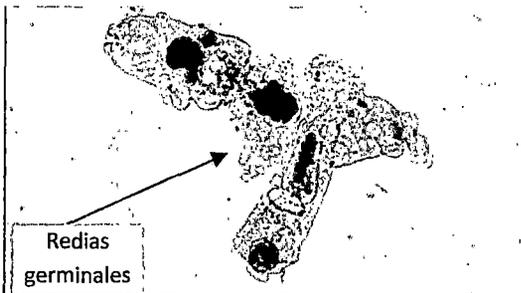


Fig. 56 Redias de primera generación desgarradas, 100X.

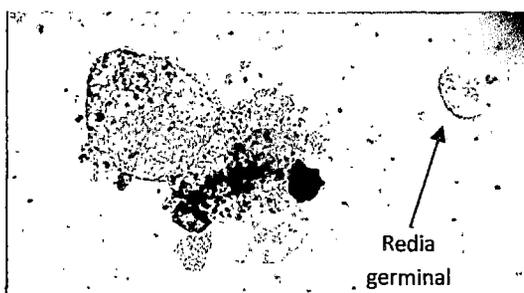


Fig. 57 Redia de primera generación desgarrada, 100X.

Al día 33 post-infección se observó que estas células germinales inician su diferenciación en redias de segunda generación también desarrollando un aparato bucal (Fig. 58 y 59).

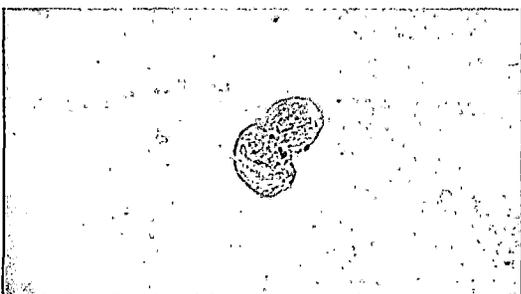


Fig. 58 Redia germinal de segunda generación, 100X.

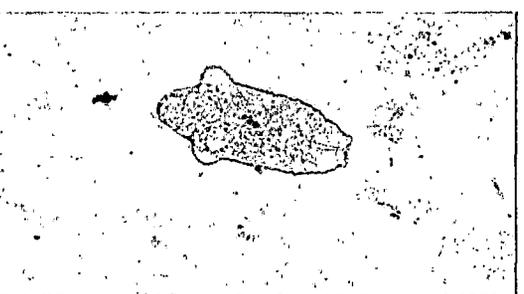


Fig. 59 Redia de segunda generación, 100X.

A los 36 días post infección se presenci6 que las redias de segunda generaci6n aumentan de tama1o r6pidamente, desarrollan dos pares de pseud6podos y una gran mancha negra despu6s de su ventosa bucal (Fig. 60 y 61),

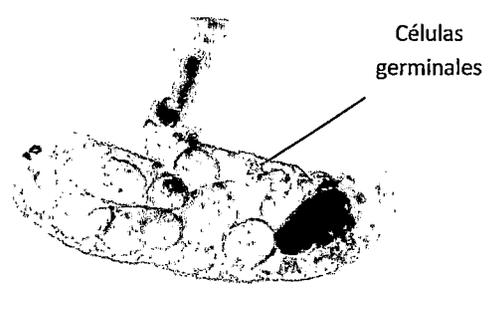
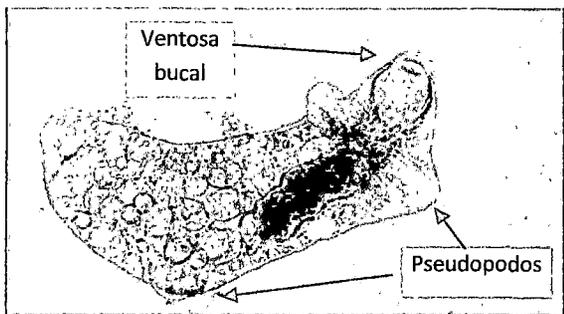


Fig. 60 Redia de segunda generaci6n, 100X. Fig. 61 Redia de segunda generaci6n, 100X.

Hasta aproximadamente el d6a 51 post-infecci6n, las redias de segunda generaci6n aumentan de tama1o, su mancha negra es m6s intensa y sus c6lulas germinales internas aumentan de tama1o y maduran adquiriendo un color m6s oscuro. (Figs. 62 - 72).

Desarrollo de *F. hepatica* a 39 d6as post-infecci6n

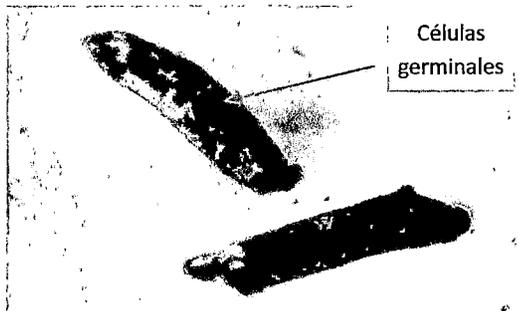
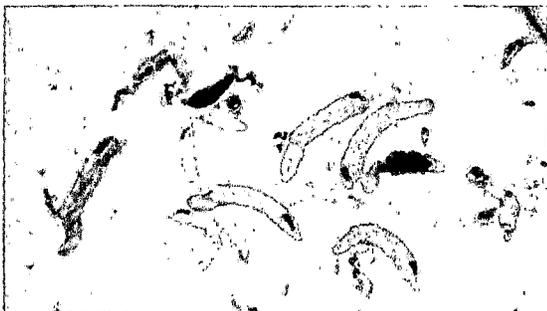


Fig. 62 Redias de segunda generaci6n, 40X. Fig. 63 Redias de segunda generaci6n, en coloraci6n compuesta alcohol, safranina, verde de malaquita (1:1:1), 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 42 d6as post-infecci6n

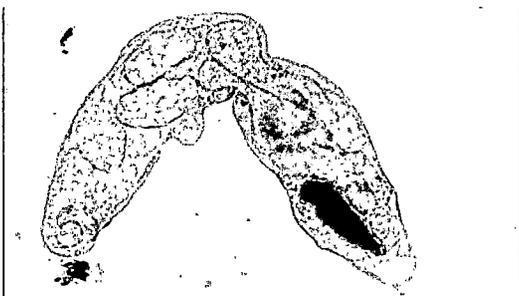
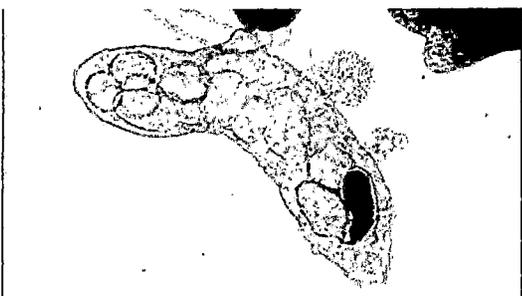


Fig. 64 Redia de segunda generaci6n, 100X. Fig. 65 Redia de segunda generaci6n, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 45 días post-infección

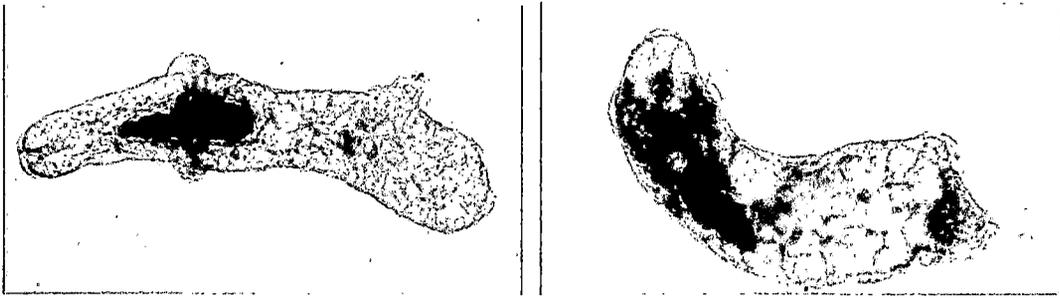


Fig. 66 Redia de segunda generación, 100X. Fig. 67 Redia de segunda generación, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 48 días post-infección

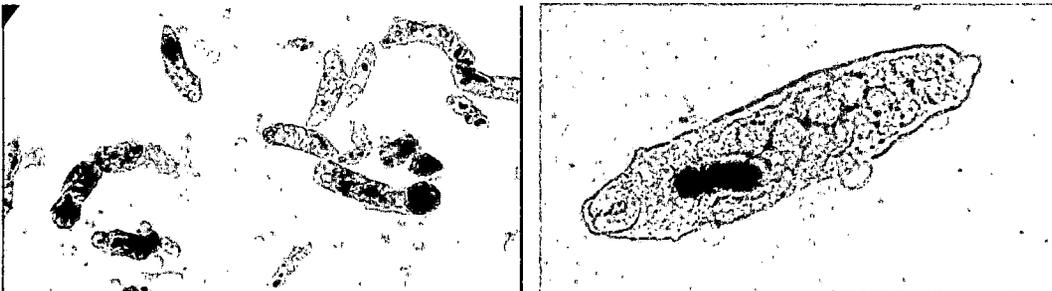


Fig. 68 Redias de segunda generación, 40X. Fig. 69 Redia de segunda generación, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 51 días post-infección

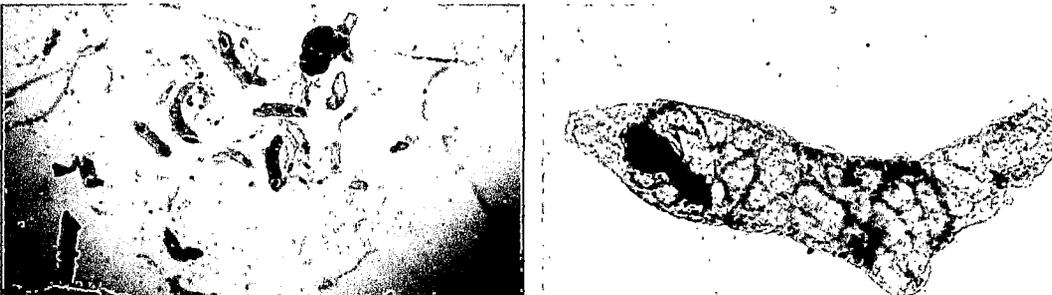


Fig. 70 Redias de segunda, vista al M. estereoscópico .

Fig. 71 Redia de segunda generación, 100X.

A los 54 días post-infección se observan las primeras cercarias al exterior de las redias de segunda generación, sin embargo aun no están maduras por lo que sus flagelos no tienen movimiento (Fig. 72 y 73).

Desarrollo de *F. hepatica* a 54 días post-infección



Fig. 72 Redias de segunda generación y cercarías, vista en M. estereoscópico.

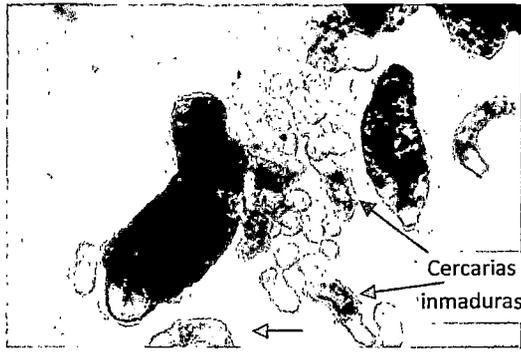


Fig. 73 Redias de segunda generación liberando su contenido interior, 100X.

A los 57 días post-infección se observa mayor cantidad de cercarias maduras libres, que tienen la capacidad de poder nadar, aunque la mayoría de redias de segunda generación mantienen sus embriones aun inmaduros (Fig. 74 y 75),

Desarrollo de *F. hepatica* a 57 días post-infección

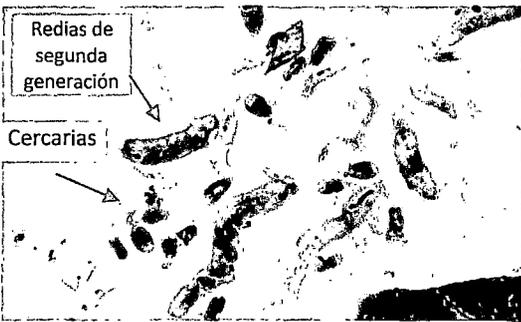


Fig. 74 Redias de segunda generación y cercarías, vista en M. estereoscópico.

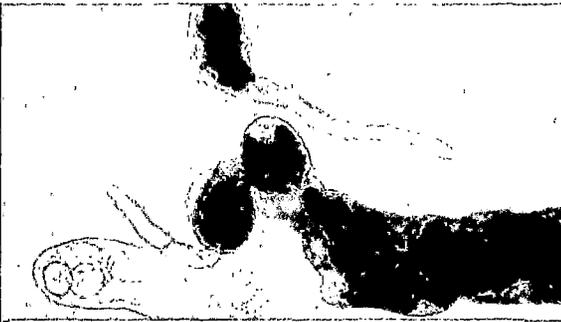


Fig. 75 Cercarias emergiendo de redia de segunda generación, 100X.

Sin embargo los subsiguiente días las cercarías maduran adquiriendo un color oscuro dentro de las redias de segunda generación, la cantidad de cercarias libres que tienen mayor capacidad de nadar gracias a su cola desarrollada, están también caracterizadas por presentar ventosas, (Figs. 76 – 79, 81, 82). Del día 63 al 72 post-infección, se observa un aumento vertiginoso en el número de cercarias maduras, que exhiben un movimiento vibratorio al momento de mover sus colas para nadar al mismo tiempo (Figs. 81 – 87) que en aproximadamente una hora después de liberadas intentan perder su cola y poder enquistar a metacercarias (Fig. 89).

Desarrollo de *F. hepatica* a 60 días post-infección

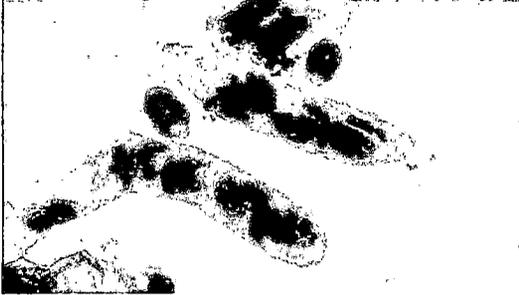


Fig. 76 Redias de segunda generación maduras y cercarías libres, 100X.

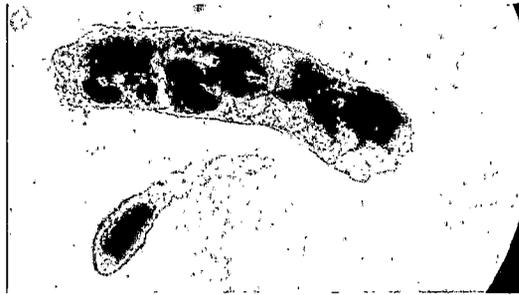


Fig. 77 Redia de segunda generación maduras y cercaría libre, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 63 días post-infección



Fig. 78 Disección de *L. viatrix* infectado, vista al M. estereoscópico



Fig. 79 Redias de segunda generación y cercarias maduras, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 66 días post-infección

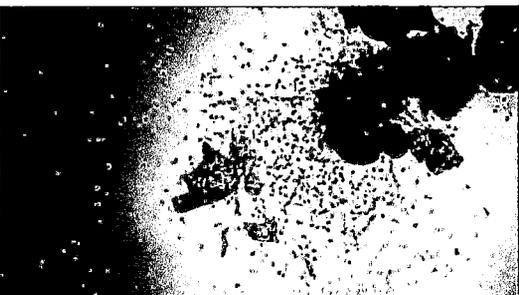


Fig. 80 Disección de *L. viatrix* infectado, vista al M. estereoscópico .

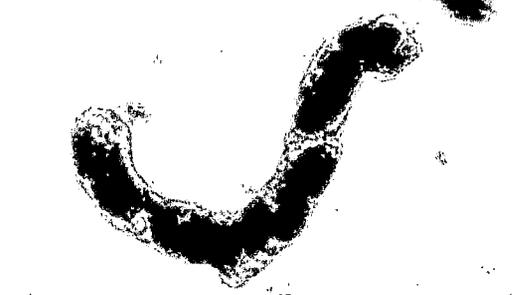


Fig. 81 Redia de segunda generación madura, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 69 días post-infección



Fig. 82 Disección de *L. viatrix* infectado, 40X.



Fig. 83 Cercaria madura, 400X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 72 días post-infección

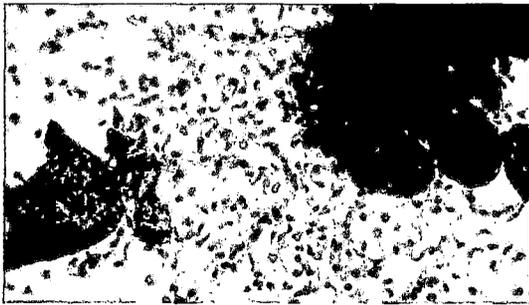


Fig. 84 Disección de *L. viatrix* infectado, vista en M. estereoscópico.

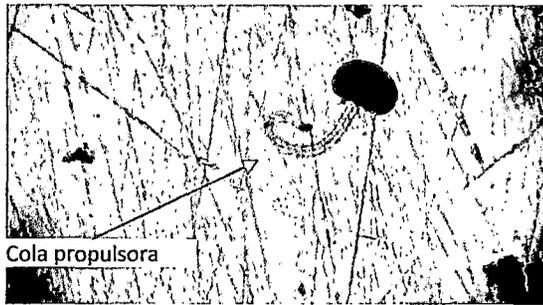


Fig. 85 Cercaria madura, 100X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 75 días post-infección



Fig. 86 Redia de segunda generación y cercarias maduras, 40X.

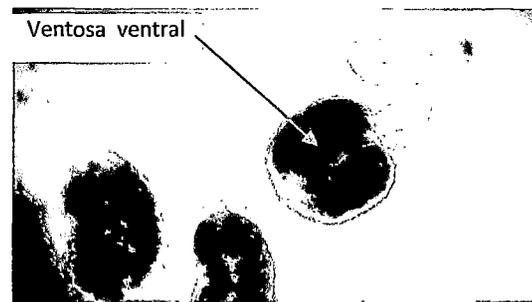


Fig. 87 Cercarias maduras, 40X.

Desarrollo de *F. hepatica* a 78 días post-infección



Fig. 88 Disección de *L. viatrix* infectado, vista en M. estereoscópico.

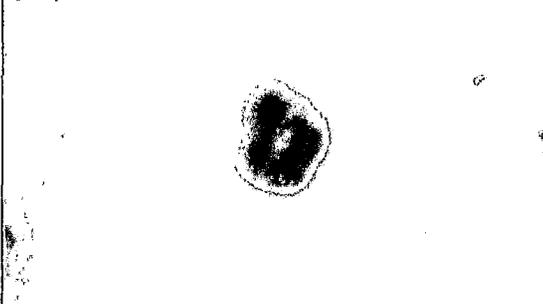


Fig. 89 Cercaria que perdió su cola, 100X.

Los días 78 y 81 post-infección, se observan pequeñas redias de tercera generación, en pequeño tamaño y número, el número de cercarias dentro del caracol disminuye (Figs 88 y 90), debido a estas larvas inician sus salidas al ambiente para poder enquistar a metacercaria y continuar con su ciclo biológico (Fig. 91).

Desarrollo de *F. hepatica* a 81 días post-infección

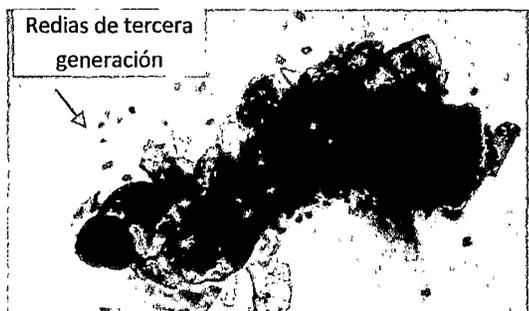


Fig. 90 Disección de *L. viatrix* infectado, vista en M. estereoscópico.

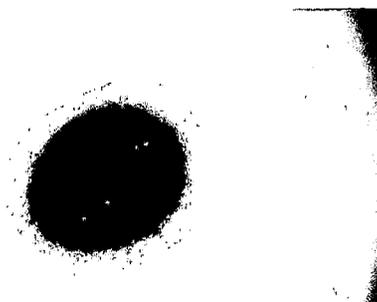


Fig. 91 Metacercaria, 400X.

Tabla 10 Número de esporocistos de *F. hepatica* observados en disección de caracoles infectados experimentalmente

Día post-infección	Numero de esporocistos encontrados					Sumatoria	Promedio de miracidios exitosos	Caracoles hallados muertos
	Caracol 1	Caracol 2	Caracol 3	Caracol 4	Caracol 5			
3	2	1	1	-	-	4	1,33	0
6	1	1	1	-	-	3	1	1
9	1	1	-	-	-	2	1	4
12	4	1	-	-	-	5	1,67	1
15	2	1	-	-	-	3	1,5	3
$\Sigma = 17$							$P = 1,47$	$\Sigma = 9$

En el M. estereoscópico y microscopio biológico de campo claro, durante la disección de caracoles, fueron observados 17 esporocistos hasta los 15 días post-infección. De los primeros 25 caracoles diseccionados, 12 caracoles contrajeron la infección con un promedio de 1,47 miracidios exitosos en penetrar al caracol y lograr desarrollar a esporocisto, se encontraron 9 caracoles muertos en el acuario, probablemente debido a no tener éxito a adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Tabla 10).

Tabla 11 Número de redias de primera generación de *F. hepatica* observados en disección de caracoles infectados experimentalmente

Día post-infección	Numero de redias G1 encontrados					Sumatoria	Promedio de Redias G1	Caracoles hallados muertos
	Caracol 1	Caracol 2	Caracol 3	Caracol 4	Caracol 5			
18	6	5	5	3	-	19	4,75	4
21	9	8	5	2	1	25	5,00	1
24	7	6	6	4	3	26	5,20	4
27	17	9	6	6	3	41	8,20	3
30	14	14	11	6	-	45	11,25	0
33	16	1	1	-	-	18	6,00	0
36	7	3	-	-	-	10	5,00	3
39	2	1	-	-	-	3	1,50	0
						$\Sigma = 187$	P = 5,86	$\Sigma = 15$

Se observaron 187 redias de primera generación desde los 18 días post-infección hasta los 39 días post-infección. De los 40 caracoles diseccionados, se confirmó que 30 caracoles contrajeron la infección y 10 no contrajeron la infección. A los 30 días post infección se observó la mayor cantidad de redias de primera generación en los caracoles con un promedio de 11,25 redias por caracol. En este intervalo de análisis se encontraron 15 caracoles muertos en el acuario. Datos expresados en la tabla 11.

Tabla 12 Número de redias de segunda generación de *F. hepatica* observados en disección de caracoles infectados experimentalmente

Día post-infección	Numero de redias G2 encontrados					Sumatoria	Promedio de redias G2	Caracoles hallados muertos
	Caracol 1	Caracol 2	Caracol 3	Caracol 4	Caracol 5			
33	17	15	-	-	-	32	16,00	3
36	51	30	30	9	-	120	30,00	4
39	49	47	45	39	-	180	45,00	0
42	57	54	31	-	-	142	47,33	2
45	94	78	24	-	-	196	65,33	1
48	80	62	72	70	66	350	70,00	0
51	112	73	47	-	-	232	77,33	3
54	108	105	96	-	-	309	103,00	0
57	98	99	-	-	-	197	98,50	0
60	102	96	95	49	-	342	85,50	0
63	28	22	20	19	-	89	22,25	2
66	20	17	14	-	-	51	17,00	1
69	11	11	10	-	-	32	10,67	1
						$\Sigma = 2272$	P = 52,92	$\Sigma = 17$

Se observaron 2272 redias de segunda generación desde los 33 días post-infección hasta los 69 días post-infección. De los 65 caracoles diseccionados, se confirmó que 43 caracoles contrajeron la infección y 22 no contrajeron la infección. A los 54 días post infección se observó la mayor cantidad de redias de primera generación en los caracoles con un promedio de 103 redias de segunda generación por caracol. En este intervalo de análisis se encontraron 17 caracoles muertos en el acuario. Datos expresados en la Tabla 12.

Tabla 13 Numero de cercarias de *F. hepatica* observados en disección de caracoles infectados experimentalmente

Día post-infección	Numero de cercarias encontrados					Sumatoria	Promedio de cercarias	Caracoles hallados muertos
	Caracol 1	Caracol 2	Caracol 3	Caracol 4	Caracol 5			
57	12	10	-	-	-	22	11,00	3
60	51	30	30	9	-	120	30,00	0
63	160	129	84	68	-	441	110,25	0
66	184	175	110	-	-	469	156,33	2
69	281	270	252	-	-	803	267,67	0
72	280	262	272	270	266	1350	270,00	1
75	209	192	170	-	-	571	190,33	2
78	102	98	97	-	-	297	99,00	3
81	75	56	48	-	-	179	59,67	0
						$\Sigma = 4252$	P=132,69	$\Sigma = 11$

Se observaron 4 252 cercarias durante la disección de caracoles, desde los 57 días post-infección hasta los 81 días post-infección. De los 45 caracoles diseccionados, se confirmó 30 caracoles contrajeron la infección y 15 no contrajeron la infección. A los 72 días post infección se observó la mayor cantidad de cercarias en los caracoles con un promedio de 270 cercarias por caracol y unas pocas pequeñas redias de tercera generación, después del día 81, los caracoles restantes perecieron. En este intervalo de análisis se encontraron 11 caracoles muertos en el acuario. Datos expresados en la Tabla 13.

3.4.4 Obtención de metacercarias a partir de caracoles infectados en la naturaleza

Al diseccionar a los caracoles de longitud mayor a 9 mm de ambas procedencias (San Jerónimo y Katañiray), se obtuvo el desarrollo de un gran número de metacercarias fértiles, caracterizadas por presentar la disposición de la capa exterior del quiste

uniforme y la morfología interior más definida, las que fueron seleccionadas para su inoculación en ratas (Figs. 92 y 93)

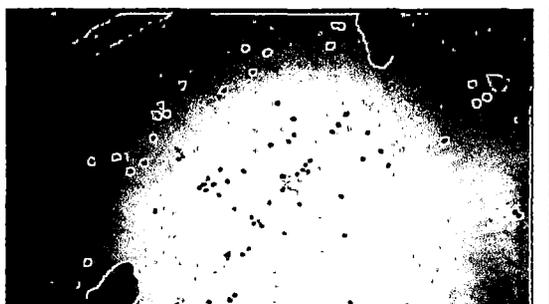


Fig. 92 Metacercarias obtenidas in vitro en placa petri.

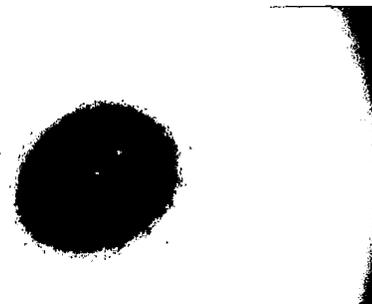


Fig. 93 Metacercaria a 400 X.

3.4.5 Análisis coproparasitoscópico de las ratas

Las ratas iniciaron la liberación de huevos el día 51 post-infección. Los exámenes coprológicos mediante el método de concentración simple por sedimentación se llevaron a cabo entre los 85 a 100 días post-infección. Se calculó la media de emisión de huevos por rata en un día (Tabla 14), para ello se obtuvo los volúmenes de los sedimentos fecales de las 6 ratas (Anexo 10), se transfirieron 0,2 mL de cada muestra en láminas porta-objetos, para el conteo de huevos (Anexo 11) con el colorante azul de metileno al 1% (Fig. 94), durante 15 días de análisis en los que se encontraron gran cantidad de huevos de *F. hepatica* (Fig. 95).



Fig. 94 Frotis de 0,2 mL de sedimento fecal de rata

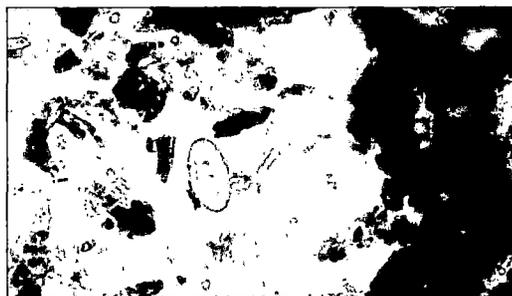


Fig. 95 Huevo de *F. hepatica* en tinción de azul de metileno al 1 %, 400X

Tabla 14 Número de huevos de *F. hepatica* emitidos por ratas infectadas, de los 86 a 100 días post-infección

Día pos-infección	Grupo A. <i>F. hepatica</i> procedente de Katañiray			Grupo B. <i>F. hepatica</i> procedente de San Jerónimo		
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 1	Rata 2	Rata 3
86	0	8125	14300	4550	0	0
87	0	9250	11400	6400	1950	0
88	0	8320	27000	5220	3500	0
89	0	12880	24700	17920	19220	0
90	0	9200	33750	24180	11550	0
91	0	4180	16380	5100	10875	0
92	0	4900	50850	25200	6000	0
93	0	10500	26245	14080	2640	0
94	0	18245	46080	96600	4060	0
95	0	13860	49560	43870	4375	0
96	0	2870	46200	44000	9000	0
97	0	7770	31920	22800	11600	0
98	0	24750	32400	32760	8700	0
99	0	2880	33005	13760	46740	0
100	0	10500	32760	23180	13440	0
Promedio	0	9899,38	31816,75	25221,99	10281,90	0

3.4.6 Necropsias de las ratas

Las ratas de ambas procedencias Katañiray (grupo A) y San Jerónimo (grupo B) se sacrificaron a los 100 días post infección, obteniendo sus hígados para la búsqueda de formas adultas de *F. hepatica*, la infección se encontraba confinada al conducto hepático común. De las 6 ratas sacrificadas, 4 presentaron lesiones hepáticas visibles (Fig. 96) y en una de ellas (rata 1B) era severa. Los 4 hígados infectados, durante su disección bajo el M. estereoscópico, confirmaron la presencia de adultos de *F. hepatica* (Fig. 97). La rata A2, presento 1 Fasciola adulta; la A3, 4; la B1, 3; y la B2, 1. Sólo una rata en ambos grupos (A1 y B3) no mostró lesiones visibles ni adultos de *F. hepatica*. (Tabla 15)

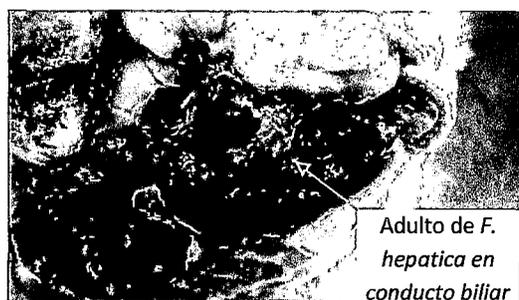


Fig. 96 Hígado de *R. norvegicus* infectado con *F. hepatica*

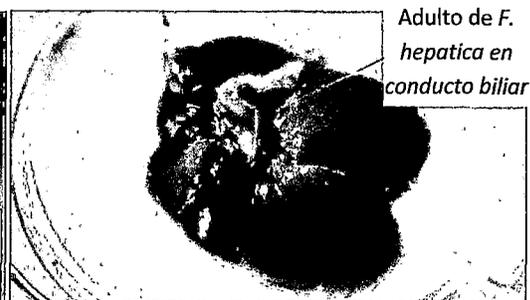


Fig. 97 Hígado de *R. norvegicus* infectado con *F. hepatica*

Tabla 15. Resultado de las necropsias de las ratas invadidas con 20 metacercarias

Grupo	Fasciolas encontradas en el hígado	Intensidad de infección (carga parasitaria)	Media	Extensión de la invasión EI. (Prevalencia) (%)	Potencia invasiva PI. (%)
Grupo A	4,1,0	5	2,5	66,67	8,33
Grupo B	3,1,0	4	2	66,67	6,67
Total		9	2,25	66,67	7,5

A los 100 días post-infección (14 semanas post-infección), la potencia invasiva y extensión de la invasión de *F. hepatica* en *R. norvegicus* de la cepa Holtzmann fue de 8,33 % y 66,67 % respectivamente para *F. hepatica* proveniente de Katañiray; y de 6,67 y 66,67 respectivamente para *F. hepatica* procedente de San Jerónimo.

Tabla 16. Longitud de los adultos de *F. hepatica* hallados en la necropsia

Rata	Longitud de las Fasciolas (mm)				Promedio
A2	15	-	-	-	15
A3	7	7	8	6	7
B1	10	8	7	-	8,3
B2	14	-	-	-	14

En la Tabla 16 se observa que los adultos de *F. hepatica* encontrados en conjunto presentan menor tamaño en comparación de los que parasitan el hígado individualmente.

Tabla 17. Resultado de las necropsias respecto al tamaño de los adultos de *F. hepatica* en *R. norvegicus*

Grupo	Longitud de <i>F. hepatica</i> en hígado (mm)		
	Mínima	Máxima	Media
Grupo A	6	15	8,6
Grupo B	7	14	9,75

En la Tabla 17 se expresan los resultados del tamaño de los parásitos adultos, el menor tamaño es de 6 mm de longitud que pertenece al grupo A (procedencia Katañiray) y el mayor de 15 mm también del grupo A, el período prepatente para la emisión de huevos de *F. hepatica* fue constante en todas las ratas infectadas, entre los 51 a 54 días post-infección.

3.5 Cálculo del potencial biótico de *F. hepatica*

Los resultados del número de larvas de *F. hepatica* cuantificados en la disección de caracoles se muestran en la Tabla 18. Cabe destacar que se ha detectado una variación en el número de las larvas de igual estadio. Por este motivo, para calcular la curva de crecimiento de *F. hepatica* fueron utilizados los promedios de cada estadio.

Tabla 18 Evolución número de estadios larvales de *F. hepatica* en función de días post-infección, Todos los valores se muestran con la media \pm el error estándar y el rango

Días post-infección	Larvas de <i>F. hepatica</i>				Total de larvas
	Miracidios/ Esporocistos	Redias 1	Redias 2	Cercarias/ Metacercarias	
3	1,3 \pm 0,33 (1-2)	-	-	-	1,33
6	1 \pm 0 (1-1)	-	-	-	1
9	1 \pm 0 (1-1)	-	-	-	1
12	2,5 \pm 0 (1-4)	-	-	-	2,50
15	1,5 \pm 0 (1-2)	-	-	-	1,50
18	-	4,75 \pm 0,63 (3-6)	-	-	4,75
21	-	5 \pm 1,58, (1-9)	-	-	5
24	-	5,02 \pm 0,74 (3-7)	-	-	5,2
27	-	8,2 \pm 2,39 (3-17)	-	-	8,2
30	-	11,25 \pm 5 (6-14)	-	-	11,25
33	-	6 \pm 0,5 (1-16)	16, \pm 0 (15-17)	-	22
36	-	5 \pm 0 (3-7)	30, \pm 8,56 (9-51)	-	35
39	-	1,5 \pm 0 (1-2)	45, \pm 2,16 (39-49)	-	46,50
42	-	-	47,3 \pm 8.2(31-57)	-	47,33
45	-	-	65,33 \pm 21,17(24-94)	-	65,33
48	-	-	70 \pm 3,03 (62-80)	-	70
51	-	-	77,33 \pm 18,9(47-112)	-	77,33
54	-	-	103,00 \pm 3.6(96-108)	-	103
57	-	-	98,50 \pm 0 (98-99)	11 \pm 0 (10-12)	109,5
60	-	-	85,50 \pm 12,6(49-112)	30 \pm 8,57 (9-51)	115,5
63	-	-	22,25 \pm 2,02 (18-28)	110,25 \pm 21.02(68-160)	132,5
66	-	-	17 \pm 1.7 (14-20)	156,33 \pm 23,31(110-184)	173,33
69	-	-	10,67 \pm 0,33 (10-11)	267,67 \pm 8,45 (252-281)	278,33
72	-	-	-	270 \pm 3,03 (262-280)	270
75	-	-	-	190,33 \pm 11,3(170-209)	190,33
78	-	-	-	99 \pm 1,53 (97-102)	99
81	-	-	-	59,6 \pm 8 (48-75)	59,67

Utilizando el software Curve Expert, versión 1,4; se ha representando mediante un gráfico de puntos el crecimiento del número de larvas de *F. hepatica* en función de

los días de infección en el caracol hospedador. El modelo de crecimiento exponencial es el que mejor que se ajusta a la dinámica de *F. hepatica*, comprendido entre los 3 y 69 días post-infección del caracol (Fig. 98).

El modelo exponencial es una representación de crecimiento poblacional, se caracteriza porque existe una aceleración del crecimiento de la población. La Tabla 19 muestra la regresión exponencial que mejor se ha ajustado a la nube de puntos cuya función es del tipo: $Nt = Noe^{rt}$, representado por el tamaño de la población al inicio (N_0), una tasa intrínseca de crecimiento (r), un tiempo de retardo (t) y una población al final (Nt)

Mediante una transformación lineal, se toma los logaritmos neperianos, para convertir el problema en una cuestión de regresión lineal: $\ln(Nt) = rt + \ln(N_0)$

Tabla 19 Valores para regresión en ajuste al modelo exponencial

Días post-infección (t=x)	Número de larvas ($N_0=y$)	$\ln(y)$	$(x)^2$	$(\ln y)^2$	$x \ln(y)$
6	1,00	0,00	36,00	0,00	0,01
9	1,00	0,00	81,00	0,00	0,01
3	1,33	0,29	9,00	0,08	0,86
15	1,50	0,41	225,00	0,16	6,08
12	2,50	0,92	144,00	0,84	11,00
18	4,75	1,56	324,00	2,43	28,05
21	5,00	1,61	441,00	2,59	33,80
24	5,20	1,65	576,00	2,72	39,57
27	8,20	2,10	729,00	4,43	56,81
30	11,25	2,42	900,00	5,86	72,61
33	22,00	3,09	1089,00	9,55	102,00
36	35,00	3,56	1296,00	12,64	127,99
39	46,50	3,84	1521,00	14,74	149,74
42	47,33	3,86	1764,00	14,88	162,00
45	65,33	4,18	2025,00	17,47	188,08
48	70,00	4,25	2304,00	18,05	203,93
51	77,33	4,35	2601,00	18,91	221,75
54	103,00	4,63	2916,00	21,48	250,28
57	109,50	4,70	3249,00	22,05	267,67
60	115,50	4,75	3600,00	22,56	284,96
63	132,50	4,89	3969,00	23,88	307,85
66	173,33	5,16	4356,00	26,58	340,24
72	270,00	5,60	5184,00	31,34	403,09
69	278,33	5,63	4761,00	31,68	388,39
$\Sigma=900,00$	$\Sigma=1587,40$	$\Sigma=73,42$	$\Sigma=44100,00$	$\Sigma=5390,54$	$\Sigma=66078,29$
P=37,50	P= 66,14	P=5,87			

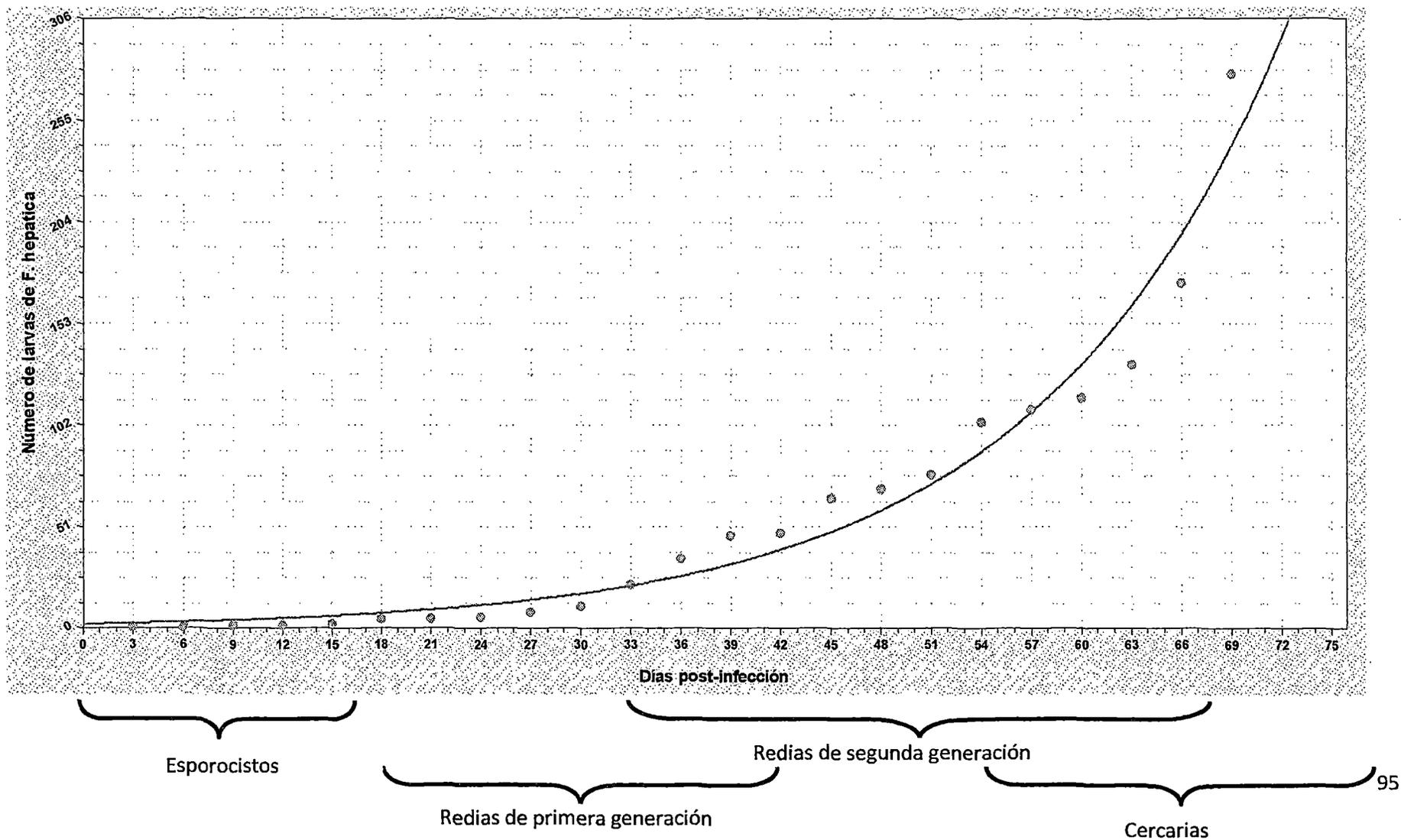
Usando la forma lineal de la regresión exponencial con los datos anteriores en las formulas siguientes:

$$r = \frac{\sum xy - \bar{y} \sum x}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}$$

$$N_0 = \bar{y} - (b\bar{x})$$

Se tiene la ecuación final que modela el sistema: $N_t = 2,3965 e^{0,06693 t}$, presenta un coeficiente de precisión de la curva $R^2 = 0.9821$ (mayor aproximación si $R=1$) y una desviación estándar de 12.8172; estadísticamente significativo en relación a la interpolación de puntos. Con la aplicación de esta función exponencial, se puede inferir la cantidad de larvas de *F. hepatica* para cualquiera de los días post-infección.

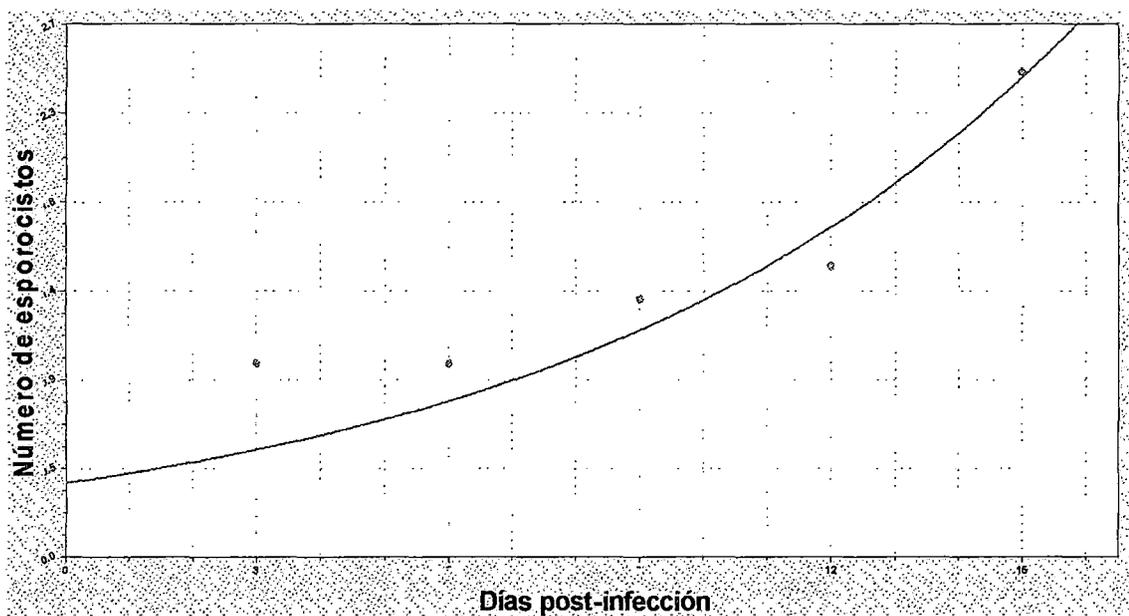
Fig. 98 Interpolación de puntos de la multiplicación partenogenética de larvas de *F. hepatica*, en el modelo de crecimiento exponencial



El potencial biótico (r) o capacidad intrínseca de reproducción de cada especie, es el resultado de la manifestación del aumento poblacional como consecuencia del crecimiento porcentual de la población, así para una población inicial $N_0 = 2,3965$ larvas de *F. hepatica* (miracidios), se obtuvo un potencial biótico $r = 6,6932$ % por día, entonces se infiere que la producción neta de cercarias por miracidio exitoso en evolucionar a esporocisto es de 203 cercarias en este modelo experimental ejecutado.

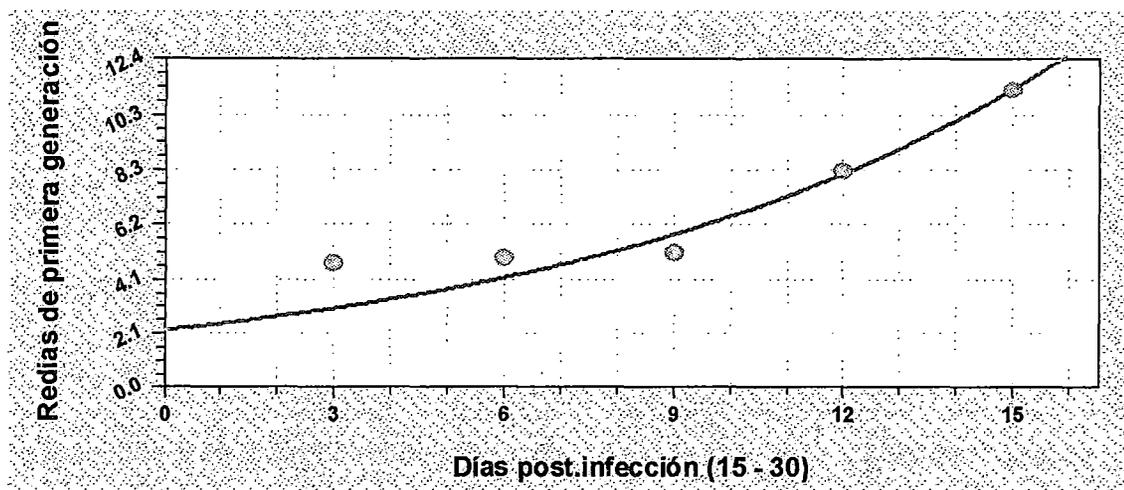
Observando la disposición de puntos en la Fig. 98, el modelo exponencial resultante está compuesto por 4 fases diferenciadas. La primera presenta un carácter casi lineal y representa el número de esporocistos; mientras que, la segunda fase, muestra un aumento en el crecimiento, representado por la generación de redias de primera generación; en la tercera fase el crecimiento se hace mayor, representado por la multiplicación de redias de segunda generación; y en la última fase el crecimiento es vertiginoso, representado por la generación de cercarias. La transición que tiene lugar entre las cuatro fases de crecimiento se denominan punto de inflexión de la curva, siendo necesario realizar las curvas de crecimiento entre estos puntos individualmente, así tenemos:

Fig. 99 Número de miracidios exitosos en infectar



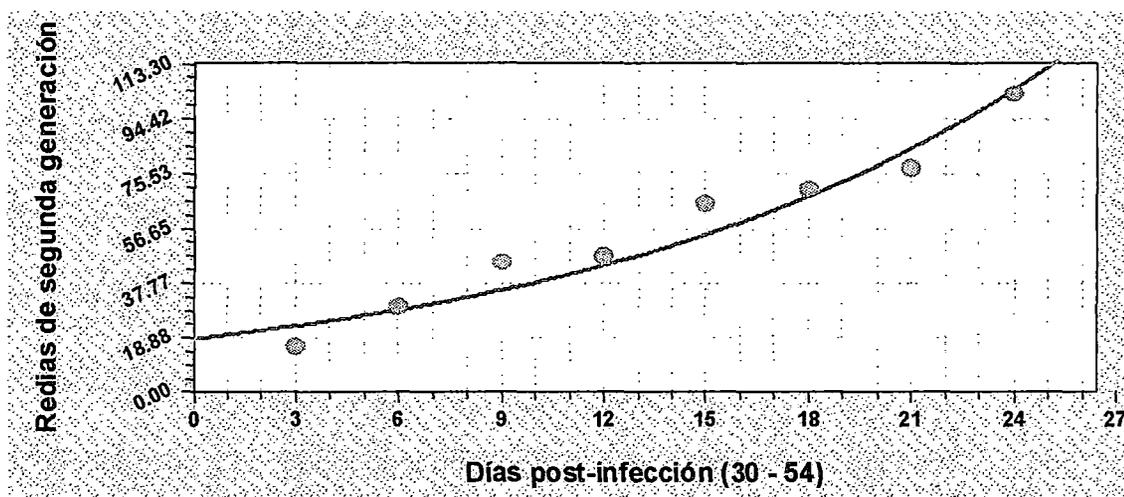
El número de miracidios que logra infectar al caracol se puede también manifestar con la ecuación exponencial: $Nt = N_0 e^{rt}$, los valores de sus coeficientes constantes son: $N_0 = 0,3837$ y $r = 0,1243$. El error estándar de la curva es de 0.3450 y su coeficiente de correlación $R^2 = 0.9330$.

Fig. 100 Crecimiento de reñas de primera generación



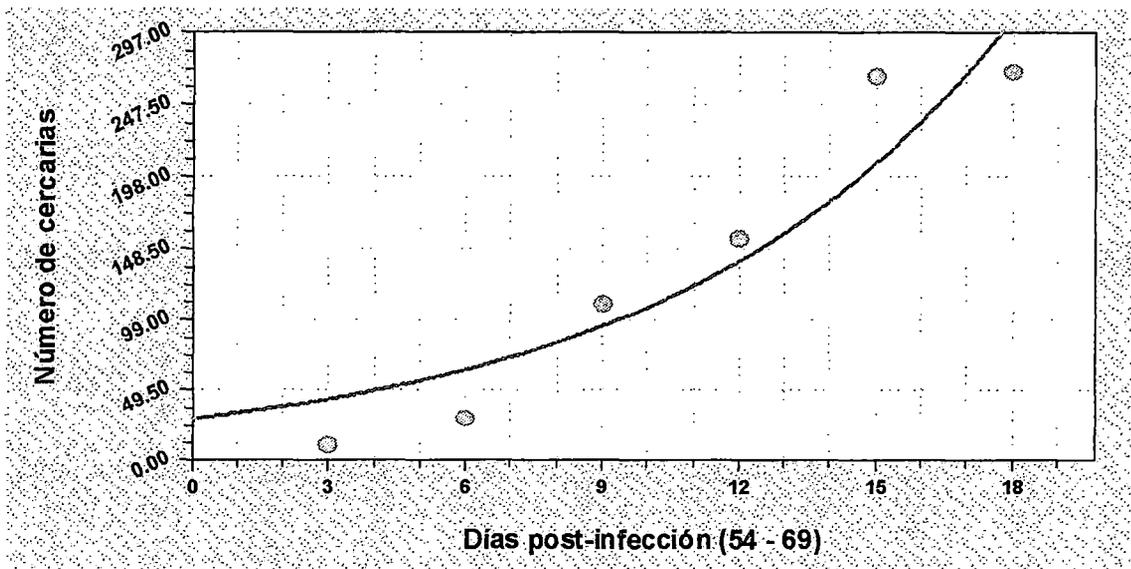
El crecimiento del número de reñas de primera generación de *F. hepatica* del 15 a 30 día post-infección, se puede expresar mediante la ecuación $Nt = Noe^{rt}$, los valores de sus coeficientes constantes son: $No = 2.1804$ y $r = 0,1097$, el error estándar de la curva es de 1.4805 y su coeficiente de correlación $R^2 = 0.9364$. Luego de los cuales la población empieza a decrecer.

Fig. 101 Crecimiento de reñas de segunda generación



El crecimiento del número de reñas de segunda generación de *F. hepatica* desde el día 30 hasta el 54 post-infección, se puede expresar mediante la ecuación $Nt = Noe^{rt}$, los valores de sus coeficientes constantes son: $No = 18,6306$ y $r = 0,0718$, el error estándar de la curva es de 9.7486 y su coeficiente de correlación $R^2 = 0.9590$. Luego de los cuales la población empieza a decrecer.

Fig. 102 Crecimiento de cercarias



El crecimiento del número de cercarias de *F. hepatica* desde el día 54 hasta el 69 post-infección, se puede expresar mediante la ecuación $Nt = Noe^{rt}$, los valores de sus coeficientes constantes son: $No = 29,4370$ y $r = 0,1304$. El error estándar de la curva es de 41.3448 y su coeficiente de correlación $R^2 = 0.9451$. Luego del cual la población de larvas dentro del caracol empieza a decrecer debido a la emergencia de las cercarias para continuar su ciclo vital.

Tabla 20 Multiplicación de larvas e *F. hepatica* en ajuste al modelo exponencial de crecimiento poblacional

Estadio larval	Población inicial (No)	Tasa intrínseca de crecimiento (r)	Tiempo post-infección en días (t)	Error estándar	Coefficiente de correlación (R ²)
Miracidios que logran desarrollar a esporocistos	0,3837	0,1243	0 - 3	0.3450	0.9330
Redias de primera generación	2.1804	0,1097	15 - 30	1.4805	0.9364
Redias de segunda generación	18,6306	0,0718	30 - 54	9.7486	0.9590
Cercarias	29,4370	0,1304	54 - 69	41.3448	0.9451

En la Tabla 20 se aprecia los coeficientes de correlación (R^2) que resultaron significativos en relación a las medidas analizadas basadas en las curvas de crecimiento de cada estadio larval de *F. hepatica* obtenidos.

Concluido el modelo de fasciolosis en caracoles limneidos en el diseño anterior se prosiguió con la obtención de metacercarias con el fin de que estas cumplan su ciclo biológico en el hospedador vertebrado elegido (*R. norvegicus*), es así que en el laboratorio se estimó el número de huevos de *F. hepatica* emitidos por día, dividiendo la media de huevos emitidos por rata/día con el número de adultos de *F. hepatica* encontrados en necropsia de cada rata, como muestra la tabla 21.

Tabla 21 Cálculo del número de huevos emitidos por adulto de *F. hepatica* en ratas infectadas con metacercarias procedentes de la Joya (Grupo A) y Huayllapampa (Grupo B)

Rata	Media de huevos emitidos por rata/día	Número de Fasciolas en cada rata	Número de huevos/adulto de <i>F. hepatica</i>
A2	9899,38±1516,5 (2870-24750)	1	9899,38±1516,5
A3	31816,75±3207,6(11400-50850)	4	7954,19±801,9
B1	25221,99±6078,23(4550-96600)	3	8407,33±2026,07
B2	10281,90±2926,35(0-46740)	1	10281,90±2926.23
Promedio	19305,005	2,25	9135,70±2196.8

La cuantía de huevos de *F. hepatica* obtenidos entre los días 86 y 100 en el sedimento fecal de cada *R. norvegicus* infectado se estimó en $9135,70 \pm 2196,8$ huevos por adulto de *F. hepatica*

Sin embargo, se observan diferencias en la cantidad de huevos emitidos en confrontación a la carga parasitaria de cada rata. De tal forma que la cantidad de huevos/adulto parece ser dependiente del nivel de infección, disminuyendo cuando aumenta la carga parasitaria.

2.3.6 Identificación de la subespecie de *C. limnaei* por comparación comprensión

La identificación de subespecie se basó en características morfológicas presentadas por (Gruffyd, 1965), para lo cual se observó en el M. estereoscópico los segmentos 2 (Fig. 103), 6, 7 y 8 (Fig. 104) de 6 ejemplares (Tabla 22).

Tabla 22 Número de quetas presentes en los segmentos 2, 6,7 y 8 de *C. limnaei*

Ejemplar	Segmento 2	Segmento 6	Segmento 7	Segmento 8
1	18	16	18	18
2	14	18	18	20
3	22	14	16	18
4	16	18	20	20
5	20	22	16	16
6	18	18	18	18
Promedio	18,00±1,15	17,67±1,08	17,67±0,61	18,33±0,61

Tabla 23 Identificación de sub-especie de *C. limnaei* por comparación comprensión

Ejemplar	Segmento 2	Segmento 6	Segmento 7	Segmento 8
Ectosimbionte	18,7	16,3	19,2	19,2
Endosimbionte	12,4	12,0	13,1	12,9
Por identificar	18,00	17,67	17,67	18,33

Para calcular el grado de asociación lineal de los 4 caracteres morfológicos mostrados en la Tabla 23, se estimó el índice de correlación de Pearson, los promedios obtenidos del número de quetas observados, son más próximos a la sub-especie ectosimbionte de *C. limnaei*, con un coeficiente de Pearson = 0,982, correlación que es significativa al nivel 0,05. El coeficiente de Pearson en relación a la subespecie endosimbionte fue de 0,944, no significativa. Los resultados indican por tanto, que existe suficiente evidencia estadística para asumir que la subespecie es *C. limnaei limnaei*.



Fig. 103 Vista de los segmentos 1 y 2 de *C. limnaei*, vista en M. estereoscópico.



Fig. 104 Vista de los segmentos 6,7 y 8 de *C. limnaei*, vista en M. estereoscópico.

2.3.7 Estimación de la eficiencia del control natural de *C. limnaei*

Para medir la eficiencia de *C. limnaei* como controlador natural de *F. hepatica*, se inoculó 10 miracidios a cada uno de los 60 caracoles de prueba divididos en dos grupos de 30 (Grupo 1, colonizados por *C. limnaei* naturalmente y Grupo 2 sin *C. limnaei*), manteniéndolos por 40 días, al cabo de los cuales se diseccionaron para buscar estadios larvales de *F. hepatica* que la evidencian.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Homogeneidad Chi-cuadrado cuyo interés se basa en determinar si la infección de caracoles de ambos grupos son significativamente homogéneos en desarrollar la infección de *F. hepatica*. Estos datos se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24 Estudio de homogeneidad en el desarrollo de infección por *F. hepatica* en caracoles con y sin *C. limnaei*

	Presencia de infección.	Ausencia de infección	Total
Colonizados con <i>C. limnaei</i>	4 (13,3%)	21 (70%)	25
No colonizados Con <i>C. limnaei</i>	21 (70%)	5 (16,7)	26
Muertos	5 (16,7%)	4 (13,3%)	9
Total	30 (100%)	30 (100%)	60

Mediante la prueba de Chi cuadrado se comprobó que *C. limnaei limnaei* no permite la infección de *F. hepatica* en limneidos en este diseño, el valor de X^2 de Pearson = 21,395, con un $p= 0,000 < 0,01$, aceptando la H_1 El desarrollo de Fasciolosis no es homogéneo en presencia del ectosimbionte *C. limnaei limnaei*, pudiendo ser este considerado como controlador natural de *F. hepatica* al 99% de confiabilidad (altamente significativo).

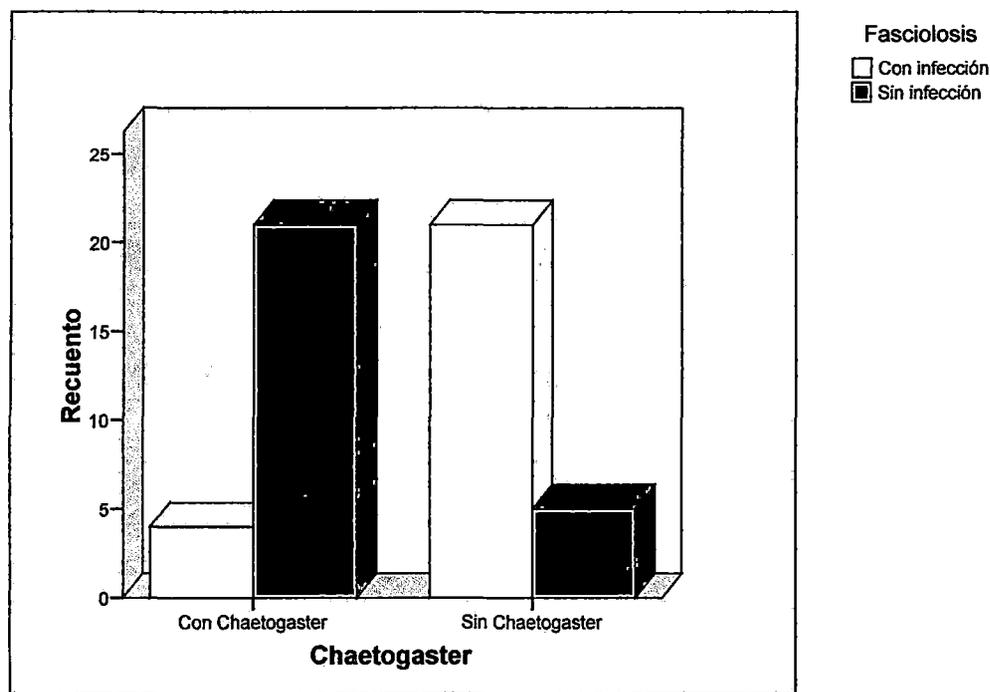


Fig. 105 Representación gráfica de *C. limnaei limnaei* como controlador natural de *F. hepatica* en infección de limneidos

2.3.8 Estimación del número de miracidios devorados por *C. limnaei* por unidad de tiempo.

A microscopía estereoscópica los ejemplares de *C. limnaei limnaei* fueron puestos en contacto con huevos, miracidios, redias, cercarias y metacercarias de *F. hepatica*, para observar sus interacciones, se visualizó que la larvas del tremátodo no pueden ser engullidas por *C. limnaei limnaei* debido al tamaño pequeño de su organismo y a la capacidad de abertura de su mandíbula, con la excepción de huevos y miracidios (Figs. 106 y 107). Para saber el número de miracidios que *C. limnaei limnaei* puede engullir en función del tiempo, se utilizó una placa de petri conteniendo una

población estadísticamente infinita de miracidios de densidad igual a $520,8 \pm 9,48$ miracidios/cm², en donde se situaron caracoles colonizados con *C. limnaei limnaei* en grupos en función del tiempo de exposición:

Grupo I: 5 caracoles por 5 minutos

Grupo II: 5 caracoles por 10 minutos

Grupo III: 5 caracoles por 15 minutos



Fig. 106 *C. limnaei limnaei* conteniendo miracidios en su estómago, vista en M. estereoscópico.



Fig. 107 *C. limnaei limnaei*, conteniendo miracidios y huevo de *F. hepatica* en su interior vista en M. estereoscópico.

Tabla 25 Número de miracidios devorados por *C. limnaei limnaei* en función del tiempo de exposición a $520,8 \pm 9,48$ miracidios/ cm^2

Grupo	Número de <i>C. limnaei</i> presente cada caracol	Número de miracidios presentes en cada Chaetogaster	Media \pm error estándar	Media grupal \pm error estándar
Grupo I	7	2,2,5,5,1,5,6	3,71 \pm 0,74	2,2037 \pm 0,22
	9	1,1,2,4,1,3,0,3,0	1,67 \pm 0,48	
	14	4,4,3,1,3,2,3,3,1,0,1,3,4,0	2,28 \pm 0,38	
	14	1,2,2,2,2,3,0,3,1,0,0,1,0,1	1,28 \pm 0,28	
	10	6,4,3,1,1,3,4,2,3,1	2,8 \pm 0,51	
Grupo II	6	5,6,9,5,6,8	6,5 \pm 0,67	4,7936 \pm 0,34
	16	1,12,1,8,5,9,3,11,2,2,0,4,2,11,9,4	5,25 \pm 1,02	
	19	2,6,7,4,3,2,7,3,1,5,10,2,1,6,6,5,2,4,6	4,31 \pm 56	
	15	2,5,8,3,2,4,6,4,3,4,4,3,3,5,3	3,93 \pm 0,41	
	7	8,4,5,4,5,7,5	5,43 \pm 0,57	
Grupo III	9	3,4,0,1,0,6,2,3,3	2,44 \pm 0,65	4,2889 \pm 0,42
	9	7,9,3,3,4,6,3,8,4	5,22 \pm 0,77	
	6	3,4,0,3,1,0,5	2,28 \pm 0,75	
	12	11,2,1,7,3,4,8,1,6,7,2,5	4,75 \pm 0,9	
	8	3,5,7,10,4,6,7,9	6,38 \pm 0,84	
Promedio	10,6 \pm 1		3,79 \pm 0,21	

Para comparar las medias grupales observadas, se utilizó la prueba del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, cuya hipótesis fue la siguiente H_0 : no existe diferencia entre las medias de miracidios devorados por *C. limnaei limnaei* en 5, 10 y 15 minutos de exposición de cada caracol.

Tabla 26 Descriptivos de la prueba ANOVA

Miracidios devorados	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
5 minutos	53	2,2453	1,60415	0,22035	1,8031	2,6874
10 minutos	63	4,7937	2,71886	0,34254	4,1089	5,4784
15 minutos	45	4,2889	2,81733	0,41998	3,4425	5,1353
Total	161	3,8137	2,67209	0,21059	3,3978	4,2296

La tabla 26 contiene un análisis descriptivo de la variable dependiente por grupos, así como, los límites superior e inferior para la media de cada grupo al 95% de confianza, mediante la prueba de homogeneidad de varianzas, se estimó el estadístico de levene = 6, 859 y una significancia de 0,05 que indica el rechazo a la hipótesis de homocedasticidad de las varianzas (las varianzas son diferentes en los tres grupos).

Tabla 27 Análisis de Varianza de miracidios de *F. hepatica* devorados por *C. limnaei limnaei* por unidad de tiempo

Miracidios devorados	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	201,037	2	100,518	16,871	,000
Intra-grupos	941,373	158	5,958		
Total	1142,410	160			

En la tabla 27 se muestra los resultados del ANOVA, el valor del estadístico de prueba, $F=16,871$, es significativamente distinto de 1 para cualquier nivel de significación y, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y queda confirmada la diferencia significativa en el número de miracidios de *F. hepatica* devorados por *C. limnaei* en diferentes tiempos.

DISCUSION

Colecta y mantención de limneidos

Es importante destacar que la facilidad de dispersión de los limneidos se debe a su capacidad reproductiva, permitiendo un mayor rango geográfico del hospedero y la infección por *F. hepatica* (Larrea *et al.*, 2007). Por ello en el Perú se encuentran caracoles por encima de 3 000 m de altitud en la presente investigación, se hallaron caracoles limneidos en el sector de Huayllapampa, San Jerónimo (Cusco) en área suburbana a 3224 m de h. y en el sector de la Joya, Katañiray (Anta- Cusco) ubicado a 3268 m de altitud. Existiendo una mayor abundancia de caracoles en Huayllapampa (150 ejemplares/ hora) a pesar de estar a mayor altura, sin embargo el sector la Joya (60 ejemplares/ hora), muestra una mayor influencia antrópica por el constate transitar de los pobladores y la reunión de niños y jóvenes en los juegos de futbol muy próximos al sector de colecta, a lo que se suma el transito vehicular, que contribuye con la contaminación sonora, además las orillas donde se capturaron los caracoles no muestra un volumen constate de agua, y su suelo es más arenoso, es un área despejada, no cuenta con la protección de una arboleda, por lo tanto el impacto climático es mayor que en Huayllapampa – San Jerónimo donde se encuentra en un eucaliptal, en un arroyo de volumen constante de agua y suelo algo más arcilloso en el área de muestreo, existiendo además otros factores menores a considerar. Aún así ambos lugares de muestreo presenta las condiciones ambientales adecuadas, para completar el ciclo biológico del parásito, lo que permite una mayor amplitud geográfica de esta enfermedad.

Hubendick (1951) citado en Prepelitchi (2009)., de una exhaustiva comparación morfológica de la familia a nivel mundial, planteó que resultaba injustificable la subdivisión en géneros o subgéneros de la familia Lymnaeidae debido a la gran uniformidad anatómica encontrada y dejó a *Lymnaea* como único género válido. Se reconoce 40 especies válidas entre las que se encuentran *L. stagnalis*, *L. palustris* y *L. truncatula* en la Región Holártica (Europa, Asia, norte de África, norte de América); *L. cubensis*, *L. bulimoides* y *L. columella* en América Central y del Norte; *L. viatrix*, *L. diaphana* y *L. coussini* en América del Sur, la discusión sobre la validez de un único género o de los 7 propuestos por Baker (1908) citado en Prepelitchi (2009) sigue vigente y genera gran confusión (Prepelitchi, 2009) .

En el Perú, se han descrito 3 especies de limneidos naturalmente infectados con formas larvianas de *F. hepática*: *L. viatrix*, *L. diaphana*, *L. columella* y una facultativa *L. cousini* (Larrea *et al.*, 2007; Londoño *et al.*, 2009) sin embargo, el Perú cuenta con varias zonas endémicas de distomatosis hepática en las que no se conoce la especie de Lymnaeidae involucrada, en algunas localidades o regiones pueden existir varias especies sin que se conozca cual de ellas es el huésped principal y cual el potencial. Estos antecedentes adquieren importancia en las migraciones humanas y cuando se desea introducir ganado vacuno u ovino en una localidad.

Mediante la comparación de caracteres externos se encontró que las medidas conquiológicas de las conchas de los caracoles colectados de ambas zonas de estudio, presentaban correlación significativa al nivel del 95% en relación a sus diferentes medidas conquiológicas con los ejemplares de *L. viatrix* del Museo Nacional de Brasil presentados en Ueta (1989) Hecho corroborado por Larrea *et al.* (2007) quién reporta *L. viatrix* en Cusco, aunque no indica exactamente la localidad de colecta ni la altitud.

En Perú no se ha reportado estudios sobre aspectos biológicos y ecológicos de limneidos en condiciones naturales ni experimentales. La información de este caracol proviene de pocos trabajos realizados en otras latitudes. En el laboratorio gracias a las condiciones controladas a que los caracoles fueron sometidos se obtuvo una eficiencia para el cultivo del 75,81% en comparación del método utilizado por Sánchez *et al.*, (1995) para *L. cubensis*, con algunas modificaciones, que obtuvo un 95% de efectividad, sin embargo es probable que haya habido diferencias en mortandad debido a la presencia del parásito y su perjuicio metabólico en caracoles de esta investigación.

Diseño experimental del ciclo biológico de *F. hepática*

En la presente investigación se comprobó que los huevos de *F. hepática* de procedencia ovina incubados en presencia de luz, desarrollan a los 11 días y 14 horas, eclosionando los miracidios, coincidiendo con lo mencionado por Iturbe & Muñiz (2010), con Quiroz (2003) que indica 9 días a 26°C, y Becerril & Romero que indican 15 días a 22°C sin embargo se difiere con Mas-coma, *et al.* (2001), quien indica un desarrollo del miracidio dentro del huevo (de procedencia ovina) de 58 días a 20 °C en condiciones de laboratorio.

Mediante la observación microscópica se concuerda con Koie *et al.* (1976), observando que el epitelio del miracidios está cubierto por largos cilios, una papila apical en su parte anterior y además se divisó un par de placas fotosintéticas indicado además por Quiroz (2003); Euzéby (2001); Athías (1999); Cordero del Campillo (1999) y Thomas & Leukart (1986), y que durante la penetración al caracol hospedador y su transformación a esporocisto después del ataque al caracol, el miracidio pierde sus cilios, y trata de situarse lo más interior del caracol que puede.

En condiciones de laboratorio se llevó a cabo la infección de limneidos con 5 miracidios de *F. hepatica* utilizando un método de estrés indicado por Abrous *et al.* (2001) para infección de *L. truncatula*, exponiendo los caracoles en agua de entre 6 – 8 °C por 15 minutos obteniendo como resultado que los caracoles sometidos a stress estaban infectados con *F. hepatica* en una proporción del 71,78 % vs 94,5 % obtenido por Abrous *et al.* (2001). Sin embargo Mas-coma *et al.* (2001), obtiene un porcentaje de infección in vitro de 69,2%, muy similar a los resultados obtenidos, pero sin métodos de estrés para caracoles.

Bouix-Busson *et al.* (1983), concluye que el porcentaje de caracoles infectados incrementa con el número de miracidios usados por caracol. En el presente estudio los caracoles limneidos utilizados para la infección experimental presentaban una longitud de la concha en el rango de 3,5 a 7 mm como valores mínimo y máximo respectivamente (Tabla 5), en comparación a lo indicado por Bouix-Busson *et al.* (1983), que infecta caracoles *Galba truncatula* exponiéndolos hasta en 5 miracidios, resultando con infección inducida sólo de los caracoles de 1 mm de longitud a menor tamaño, con un máximo de infección en los caracoles de 0,5 mm de longitud. Diferencias de prevalencia de infección debido posiblemente a que los caracoles de longitud menor a 1 mm de *G. truncatula* son mas receptivos a la infección por tener el grosor del manto de fácil penetración para el miracidio y ser considerados hospedadores ideales de la fasciolosis como lo indica Prepelitchi (2009).

Quiroz, (2003) indica que el estado de nutrición y desarrollo del caracol es mejor cuando se encuentra en depósitos acuáticos ricos en algas que en medios secos, fríos y en arroyos claros, Belfaiza, *et al.* (2004) afirma que “El incremento en la frecuencia de la infección de dos esporocistos demuestra que la calidad de la comida tiene un efecto

significativo en la cantidad de redias de *F. hepatica* desarrolladas dentro de *G. truncatula* (= *L. truncatula*). En esta investigación se optimizó el cultivo del caracol hospedador usado en este diseño experimental, mediante el uso de berro (*Nasturtium officinale*) y algas (*Spyrogira* y *Oscillatoria*) provenientes de su mismo biotopo. La infección experimental tubo un promedio de 1,47 esporocistos desarrollados, considerando en todos los casos una normal generación de redias , por lo que se supone que la primera redia madre desarrolló óptimamente y la primera redia hija (redia R2a) constituyó el primer gran grupo de redias libres que produjeron altos porcentajes de cercarias.

En seguida de penetrar al caracol hospedador, como lo indicó Koie *et al.* (1976) y observado en este estudio, la superficie del miracidio es suave sin cilios pero todavía conserva su papila apical, después de pocos días el tegumento del esporocisto presenta micro-vellos y la papila apical y las estructuras sensoriales desaparecen es así que el miracidio se despoja de sus placas epiteliales durante la migración y se transforma en esporocisto madre después de 15 minutos de ingresar al caracol (Koie *et al.*, 1976), este posee el tamaño similar al miracidio (150 μm aproximadamente) y a través del tiempo toma una forma esférica que crece y se elonga pero sin tener tomar aspecto filiforme como lo indica Koie (1976), mientras que Ginetsinskaya (1988) indica que a una temperatura optima de 18 C°, la metamorfosis del miracidio a esporocisto toma aproximadamente 12 horas.

Con respecto a la localización parasitaria, según Dalton (1999) Cuando la penetración del miracidio ocurre en el manto, la madre esporocisto se localiza en la zona alrededor del riñón y corazón del caracol, si la penetración del miracidio ocurre por el pie, el esporocisto se localiza en el pie, manto o alrededor de la zona entre el riñón y corazón, mediante las primeras disecciones de los caracoles en la presente investigación, los esporocistos recientes se encontraron en el pie durante su migración, y a los 6 días post-infección, en general se situaron en las células renales, corazón y/o hepatopáncreas del caracol.

A los 15 días post-infección se observó que la madre esporocisto se reproduce asexualmente por división mitótica a la primera generación de redias, las cuales se liberan por rompimiento de las paredes del cuerpo de la madre esporocisto que

inmediatamente muere, en coincidencia con lo indicado por Ginetsinskaya (1988), sin embargo este autor indica que a partir de su pared se forman de 5 a 10 masas germinativas que se convierten en redias germinales, durante el presente diseño experimental, se calculó en promedio 8 redias de primera generación, generadas por cada esporocisto, Aunque (Rondelaud & Barthe, 1987), mencionan que la productividad de la madre esporocisto, medido por el número de redias y el número de cercarias en una redia, es relativo al tamaño de los caracoles infectados. Dalton (1999) indica que cada generación de redias está compuesta de cohortes por ejemplo: primera, segunda, tercera, etc., mediante las condiciones controladas del laboratorio, se pudo observar mayoritariamente sólo dos generaciones, y escasas pequeñas redias de tercera generación, después del día 81 post-infección.

El período prepatente (antes de la emergencia de cercarias), duró entre los días 54 y 57 días post-infección, y es considerado estándar cuando es comparado con estudios similares en los que se señala 48 a 58 días (Mas-coma, *et al.*, 2001) en laboratorio, con material biológico procedente del Altiplano boliviano; y (Rondelaud & Barthe, 1987), en caracoles *L. truncatula* (= *Galba truncatula*) en el ambiente, en Europa. Sin embargo Carrada (2007) en México, indica que el proceso de poliembrionía suele tener generalmente dos generaciones que duran de 25 a 35 días y está regulada por la temperatura ambiental, afirmación coincidente con lo indicado según Lee *et al.* (1995), quien afirma que la producción total de metacercarias en caracoles *L. viridis* es influenciada por la temperatura durante la infección, indicando que la liberación de cercarias se inicia al día 27 post-infección y los caracoles infectados con tres o cinco miracidios producen más metacercarias que los infectados con un solo miracidio, en contraste la liberación de cercarias en éste estudio se dio a los 54 días post-infección, sin embargo en este diseño experimental, se observó que las primeras cercarias, aun no estaban maduras teniendo a sus colas sin propulsión (Fig. 72 y 73). A los 57 días post-infección se observó mayor cantidad de cercarias maduras libres, que tienen la capacidad de poder nadar, aunque la mayoría de redias de segunda generación mantienen sus embriones aun inmaduros, este retardo en la emergencia de cercarias podría deberse las condiciones ambientales diferentes en la que los caracoles fueron mantenidos, referidos a temperatura, humedad y presión atmosférica, considerando lo que indica Mas-coma, *et al.*, (2001) como estrategias asociadas a la adaptación a

condiciones de altura. Las especies europeas de limneidos como *Galba truncatula* (= *L. truncatula*), se observa que tienen un periodo de vida post-infección de 70 días (Rondelaud & Barthe, 1987; Mas-coma, *et al.*, 2001) y en limneidos americanos hasta los 119 días para *L. viatrix* (Mas-coma, *et al.*, 2001). En el presente estudio, los caracoles perecieron entre los 84 y 92 días después de la infección. Los caracoles mueren durante el periodo de liberación de cercarias. Este periodo de emergencia es muy corto, Rondelaud & Barthe, 1987 observaron a 102 caracoles el primer día, el número se redujo drásticamente a 56 en el segundo día y subsecuentemente decrece en el día 76 a 4 caracoles.

Con respecto a la infección en ratas, cuando el número de trematodos que invade el hígado es muy elevado (es decir, una fuerte dosis de metacercarias migrando simultáneamente al parénquima hepático), aumenta el tiempo requerido, por los trematodos juveniles, para alcanzar la madurez en los canales biliares y también, por ello, aumenta el tiempo para iniciar la puesta y emisión de huevos a través de las heces del hospedador (Boray, 1984). La liberación de huevos de *F. hepatica* a través de las heces de *R. norvegicus* inició el día 51 post-infección casi coincidiendo con Prepelitchi *et al.*, (2003) cuyas ratas infectadas in vitro tuvieron un periodo pre-patente post infección de 44 – 49 días. En ovejas infectadas con 200 metacercarias, el periodo prepatente es de 63 días, mientras que en la misma especie hospedadora pero con infecciones más severas (infectadas con 2000 metacercarias) los huevos aparecen a las 13-15 semanas después de la ingestión (Boray, 1984). Se infiere de estos resultados que el periodo prepatente, (antes de la liberación de huevos de *F. hepatica*) se presenta en función del tamaño del hospedero definitivo, siendo más temprano cuando posee menor tamaño y viceversa.

Potencia invasiva de *F. hepatica*

Ordoñez, (2009) Infectó ratas con 20 metacercarias/rata vía oral, mediante el uso de sondas estomacales, para medir la intensidad de infección mediante el número de trematodos por hospedador en el canal biliar principal y observaron que se manifestó el “crowding effect” (inhibición competitiva), es decir, en las últimas fases de desarrollo del trematodo, las tasas de crecimiento de las medidas corporales son más altas cuando menor es la carga parasitaria, repercutiendo en el tamaño de los trematodos, pudiendo

indicar que el número de huevos por gramo de heces tiende a desestimar la carga parasitaria, en el presente estudio se observó cierta coincidencia con Ordoñez (2009), al momento de medir la longitud de los tremados durante la necropsia de las ratas, se observó que los adultos de *F. hepatica* encontrados en conjunto presentan menor tamaño en comparación de los que parasitan el hígado individualmente (Tabla 16).

Los resultados obtenidos en el porcentaje recobrado de los adultos maduros de *F. hepatica* en las ratas infectadas con 20 metacercarias y sacrificadas a los 100 días de infección presentó una potencia invasiva $PI = 6,67\%$ para la fasciolosis procedente de San Jerónimo y $PI = 8,33\%$ para la fasciolosis procedente de Katañiray, ambos valores por debajo de los obtenidos por Olazabal *et al.* (1999) a los 21 días post-infección, obtiene una $PI = 23\%$ en ratas Wistar. Esta diferencia puede deberse a la expresión de inmunidad de las ratas, pues según Olazabal *et al.* (1999), a partir de la séptima semana disminuye la cantidad de parásitos en los animales infectados, y también a diferencias de receptividad entre razas de ratas, pudiendo ser la Holtzmann menos receptiva que la Wistar a la infección por *F. hepatica*.

Potencial biótico de *F. hepatica*

El potencial biótico es el valor máximo de crecimiento poblacional que se alcanza cuando las condiciones son óptimas para una población, *F. hepatica* es un parásito complejo y “avanzado” (Carrada, 2007). El miracidio, encuentra la especie de *Lymnaea* adecuada, e inicia una “explosión reproductiva” en cadena, es decir, las redias madres existentes dentro del esporocisto son liberadas y de inmediato comienzan a generarse las redias hijas. Finalmente, salen las cercarias bien diferenciadas (Becerril & Romero, 2004; Carrada, 2007). El modelo de crecimiento exponencial $N_t = N_0 e^{rt}$ es el que mejor que se ajustó a esta dinámica de *F. hepatica*, comprendido entre los 3 y 69 días post-infección del caracol en el presente diseño experimental, calculándose una producción media de 203 cercarias originadas por miracidio exitoso en infectar al caracol hospedador y 270 cercarias emitidas por caracol, similar a lo establecido por y Dreyfuss y Rondelaud, (1994), que estiman 238,5 cercarias emitidas por caracol, indicando además que el número de cercarias emitidas es independiente del número de miracidios usados en la infección por caracol, cercano a los indicado por Mas-coma, *et al.* (2001) quien calcula de 384 a 562 cercarias producidas por caracoles del norte

altiplánico de Bolivia, no coincidiendo con Olazabal *et al.* (1999), quién obtiene 31,6 cercarias por caracol *L. cubensis*, tampoco con Lee *et al.* (1995) quién encuentra en invasiones artificiales de *L. viridis* en Corea del Sur, un máximo de 1220 cercarias por miracidio con una temperatura de 20°C con una mortalidad de los caracoles de 42,2 %.

Al madurar *F. hepatica* en conductos biliares inicia la emisión de huevos al medio externo mediante la materia fecal de su hospedador vertebrado, esto constituye el factor biológico que marca la transición de la curva, es decir, el punto que divide la fase de crecimiento exponencial de la fase de saturación en la dinámica de *F. hepatica* (Ordoñez, 2009), se estimó mediante la técnica de concentración por sedimentación de Lumbreras que el número de huevos por adulto de *F. hepatica* en *R. norvegicus* es de $9135,70 \pm 2196,8$, dicho cálculo esta dentro del límite señalado por Carrada (2007), quién indica que la *Fasciola* adulta pone entre 10,000 y 20,000 huevos al día Sin embargo, se observan diferencias en la cantidad de huevos emitidos en confrontación a la carga parasitaria de cada rata. De tal forma que la cantidad de huevos/adulto parece ser dependiente del nivel de infección, disminuyendo cuando aumenta la carga parasitaria esto es conocido como “crowding effect” traducido a inhibición competitiva (Ordoñez, 2009). Una relación similar entre la carga parasitaria y la producción de huevos ha sido demostrada en ovejas, oscilando desde una media de 25000 huevos/día/parásito adulto en infecciones leves y hasta 8800 huevos/día/parásito adulto en infecciones más severas (Boray, 1969).

Eficiencia del control natural de *C. limnaei limnaei*

Mediante la prueba de homogeneidad Chi cuadrado al nivel 0,05 se comprobó que *C. limnaei limnaei* no permite el desarrollo de *F. hepatica*, pudiendo ser considerado como controlador natural de *F. hepatica*. Concordando con Ibrahim, (2007) en Alemania, quién concluye que *C. limnaei*, es simbióticamente asociado con caracoles vectores de enfermedades parasitarias, pudiendo tener implicaciones importantes en relación con el control biológico y / o cambios en la epidemiología de estos parásitos, como es el caso del estudio de Rodgers *et al.* (2005) en Estados Unidos, quienes realizan un estudio de las interacciones inter-específicas entre *C. limnaei limnaei*, el tremátodo *Schistosoma mansoni*, y un caracol acuático (*Biomphalaria glabrata*). Observando que la prevalencia de la infección de *Schistosoma* fue significativamente

mayor en los caracoles que carecían de los *C. limnaei limnaei* en relación con aquellos que fueron colonizados por estos comensales, indicando que *C. limnaei limnaei* puede proteger al caracol hospedero de infecciones por trematodos. Rodgers *et al.* (2005). El porcentaje de supervivencia de los caracoles colonizados con *C. limnaei* fue del 70% por debajo del indicado por Rodgers *et al.* (2005) que indica una supervivencia de los caracoles del 85%. No obstante ambos muestran significancia en el control de *F. hepatica* en limneidos. Rajasekariah, (1978) en Suiza observa en el laboratorio que *C. limnaei* destruyen las fases larvianas de *F. hepatica*. Lo cual no coincide con lo observado, debido a que el tamaño de anélido *C. limnaei limnaei* no le permite devorar esporocistos, redias, cercarias ni metacercarias por poseer tamaños, confrontación observada en el microscopio y M. estereoscópico; y además los esporocistos y redias desarrollan sólo en el interior de su huésped intermediario, lugar donde no presentan contacto directo con *C. limnaei limnaei*, según lo observado, debido al pequeño tamaño de su organismo y capacidad de abertura de su boca, solamente puede engullir miracidios y en menor proporción huevos de *F. hepatica* debido a que estos últimos son difíciles de detectar por no tener movimiento, como lo corroboran las Figuras 106 y 107. Estos resultados indican que el control natural acontece sólo evitando el ingreso del miracidio.

Adicionalmente, se determinó el número de miracidios devorados por *C. limnaei limnaei* en 5, 10 y 15 minutos de exposición del caracol a una placa petri conteniendo una población de miracidios de densidad igual a $520,8 \pm 9,48 / \text{cm}^2$, se utilizó el análisis de varianza ANOVA de una vía, aceptando diferencias significativas en el número de huevos devorados a diferentes tiempos a un nivel de 0,05, lo cual indica que el control natural que ejerce en el caracol incluye una buena protección a través del tiempo, sin embargo, la infección aún ocurre pero en menores porcentajes debido probablemente a que el ingreso de los miracidios de *F. hepatica* podrían facilitarse en puntos tales, donde las bocas de los *C. limnaei limnaei* no pueden alcanzar, sobre todo cuando parte del cuerpo del caracol sale de su concha (pie, cabeza y tentáculos), puesto que *C. limnaei limnaei* actúan disponiendo su parte posterior fija en el manto del caracol teniendo un radio de alcance limitado. Estos resultados demuestran que la asociación comensal de *C. limnaei limnaei* y el caracol hospedero intermedio tiene potencial valor como medida de control contra la fasciolosis.

CONCLUSIONES

En el estudio experimental del ciclo de *F. hepatica*, y la evaluación de la eficacia de *C. limnaei* como su controlador natural en laboratorio, se concluye que:

1. Los limneidos hallados en las áreas de estudio, presentaron un índice de abundancia por unidad de esfuerzo de 150 ejemplares en Huayllapampa (San Jerónimo, Cusco) y 50 ejemplares en la Joya (Katañiray, Anta, Cusco), considerados un potencial hospedador intermediario de *F. hepatica* a nivel local, y dadas sus características biológicas, se mantuvo en condiciones controladas de laboratorio con un 75,81% de eficacia.
2. El modelo de crecimiento exponencial es el que mejor se ajusta a la dinámica de *F. hepatica* en limneidos; siendo su potencial biótico $r = 6,6932\%$ por día, con una producción media de 203 cercarias por miracidio y 270 cercarias por caracol; y el número de huevos emitidos por adulto de *F. hepatica* en *R. norvegicus*, es de $9135,70 \pm 2196,8$, en condiciones controladas de laboratorio.
3. A los 100 días post-infección, la potencia invasiva en ratas Holtzmann fue de 8,33 % para de *F. hepatica* procedente de Katañiray y de 6,67 % para *F. hepatica* procedente de San Jerónimo; la extensión de la invasión en ratas Holtzmann fue de 66,67 % para *F. hepatica* de ambas procedencias, inoculando metacercarias procedentes de caracoles infectados en la naturaleza.
4. La asociación simbiote de *C. limnaei limnaei* y el caracol hospedero intermedio tiene potencial valor como medida de control contra la fasciolosis, con una eficacia de protección del 70%. Vs 16.7% de infección, con un nivel de significancia de 0,05. Siendo *C. limnaei limnaei* considerado como predador de miracidios de *F. hepatica*.

SUGERENCIAS

1. Determinar geográficamente más focos de infección de fasciolosis, mediante el reconocimiento de los biotopos de caracoles limneidos, para llevar a cabo planes de control de esta zoonosis de importancia pública en nuestra región.
2. Utilizar el método de crianza alternativo ejecutado en este estudio para la crianza y mantención de caracoles limneidos de importancia médica.
3. Tomar el diseño experimental de esta investigación con otras especies de limneidos de la región, para obtener mayor información de la dinámica poblacional de *F. hepatica*; de la susceptibilidad de los caracoles a contraer la infección; obtener todos los estadios del ciclo biológico de *F. hepatica* en laboratorio y poder idear nuevas pruebas de control de esta parasitosis.
4. Inducir infección de ratas con diferentes números de metacercarias, para realizar estudios del “crowding effect” (inhibición competitiva), y su relación con la potencia invasiva, crecimiento y número de huevos emitidos por parásito.
5. Estudiar métodos para la crianza intensiva in vitro de *C. limnaei limnaei*, y difusión de estos en biotopos infestados con limneidos como medida de control biológico contra la fasciolosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcaíno H, Apt W. 1989. *Algunos antecesores sobre fasciolosis animal y humana Monog.* Vel.;11:14-29.
2. Abrous, M., Rondelaud, D. & Dreyfuss, G. 2001 *The stress of Lymnaea truncatula just before miracidial exposure with F. hepatica increased the prevalence of infection.* United States. *Exp Parasitol* 99(1): 49-51.
3. Athías, A. 1999. *Parasitología clínica.* 3^{ra} Ed. Mediterráneo. Santiago de Chile, Chile.
4. Becerra M. 2000. *Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de Fasciola hepática en Latinoamérica.* Rev. Col. Cienc. Pec. Vol. 14: 1.
5. Becerril, F. & Romero, C. 2004. *Parasitología Médica.* Ed. Mc Graw Hill, México.
6. Belfaiza, M., Rondelaud, D., Moncef, M. & Dreyfuss, G. 2004. *F. hepatica: cercarial productivity of redial generations in long-surviving Galba truncatula.* England. *J Helminthol* 78(2): 115-120.
7. Boch, J. & Suppered, R. 1978. *Parasitología en medicina veterinaria.* Ed. Hemisferio Sur S. A., Munich, Alemania.
8. Boray J.C, Fraser G.C, Williams J.D y Wilson J.M. 1984. *The occurrence of the snail Lymnaea columella on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to Fasciola hepatica.* Australian veterinary Journal, 62:4-6.
9. Bouix-Busson, D., Rondelaud, D. & Prevost, J. 1983. *Effect of the number of miracidia and age of the mollusc on the survival and degree of infestation of Lymnaea glabra Muller by F. hepatica.* France *Ann Parasitol Hum Comp* 58(4): 347-352.
10. Botero D. & Restrepo M. 2004. *Parasitosis tisulares por tremátodos.* 4^o ed. Medellín, Colombia.
11. Cardozo, C. M., Mrad, A, Martinez, C., Rodriguez, E. & Lolas F. 2007. *El animal Como Sujeto Experimental, Aspectos Técnicos y Éticos.* 1ra edición, Ed, CIEB, Universidad de Chile, Chile.

12. Carrada, T. 2003. *Fascioliasis: diagnóstico, epidemiología y tratamientos*. Rev Gastroenterol Mex. (68)2:135-42.
13. Carrada, T. 2007. *F. hepatica; Ciclo biológico y potencial biológico*. Revista Mexicana de Patología Clínica, Vol. 54, Núm. I, pp 21-27.
14. Cordero del Campillo, M., Rojo F., Martínez A., Sánchez C., Hernández S., Navarrete J., Díez P., Quiroz H. & Carvalho M.1999. *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Grau Hill Interamericana. Madrid, España.
15. Dalton, J. P. 1999. *Fasciolosis*. Ed. CABI Publishing. Dublin City University, Republic of Irelands.
16. Dabrowski, G & Herrero E. 2008. *Método alternativo para la administración oral en ratas y ratones*. En bioterios.com Aprendiendo de los animales de laboratorio.
17. Duménigo B., Espino A. 1999. *Kinetics antibody based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with F. hepatica*. Vet Parasitol.;86:23-31.
18. Euzéby, J. 2001. *Los parásitos de las carnes*. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.
19. Fried, B. 1997. *An Overview of the Biology of the Trematodes*, Ed. In Chief. CRC Pres, Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 1-30.
20. Ginetsinkaya, T. 1988. *Trematodes, their Life Cycles, Biology and Evolucion*. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.
21. Gruffydd, Ll. D. 1965. *Evidence for the existence of a new subspecies of Chaetogaster limnaei (Oligochaeta)*, in Britain. J. Zool 146: 175-196.
22. Hopkins, DR. 1992. *Homing in on helminths*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 46: 626-634.
23. Ibrahim, M. 2007. *Population dynamics of Chaetogaster limnaei (Oligochaeta: Naididae) in the field populations of freshwater snails and its implications as a potential regulator of trematode larvae community*. Germany. Parasitol Res 101(1): 25-33.
24. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. 2006. Curso de Malacología Médica, *Taxonomía e identificación de moluscos*. Laboratorio de Malacología, Cuba.

25. Instituto Nacional de Salud. 2003. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre*. Ministerio de Salud. Lima, Perú.
26. Iturbe, P. & Muñiz, F. 2010. *Desarrollo de huevos de F. hepatica a partir de huevos aislados de la vesícula biliar de ovinos y vacunos, expuestos a luz y oscuridad*. Neotropical Helminthology, Vol. 5, nº1, pp. 89-93.
27. Koie, M., Christensen, N. O. & Nansen, P. 1976. *Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of F. hepatica*. Germany, west. *Z Parasitenkd* 51(1): 79-90.
28. Larrea, H., Vivar, R., Huamán, P. & Pachas, L. 1993. *Clave de identificación de las especies de la familia Lymnaeidae vectores de la fasciolosis en el Perú*. Boletín de Lima 89: 85-96.
29. Larrea, H.; Flórez M.; Vivar R.; Huamán, P. & Velásquez, P. 2007. *Hospederos intermediarios de F. hepatica en el Perú*. Revista Horizonte Médico Vol. 7, nº 1, pp. 39-46.
30. Lee, C., Cho, S. & Lee, C. 1995. *Metacercarial production of Lymnaea viridis experimentally infected with F. hepatica*. Netherlands. *Vet Parasitol* 58(4): 313-318.
31. Llop, A, Valdés-Dapena, V & Suazo, S. 2001. *Microbiología y parasitología médica*. Tomo III, Ed. Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana Cuba.
32. Londoño, P., Chávez, A., Li, O., Suárez, F. & Pezo D. 2009. *Presencia de caracoles lymnaeidae con formas larvarias de F. hepatica en altitudes sobre los 4000 msnm en la sierra sur del Perú*. Rev. Inv. Vet. Perú; 20 (1): 58-65
33. Malek, E. & Cheng, T. 1974. *Medical and economic malacology*. Academic Press, New York, U. S. A.
34. Martínez, J. 2005. *La Rata de Laboratorio y el Bioterio de la Unidad Sur CINVESTAV*. Ed. Matices, Santiago de Chile.
35. Mas-Coma MS, Esteban J & Bargues MD. 1999. *Epidemiología de la fasciolosis humana: revisión y propuesta de una clasificación*. Bull World Health Org. b;77(4):340-6.
36. Mas-Coma, S., Funatsu, I. & Bargues, M. 2001. *F. hepatica and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America*. England. *Parasitology* 123 Suppl: S115-127.

37. Mas-coma S., Valero MA. & Bargues MD., 2009 *Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis*. Vet. Parasitol., 163: 264-280.
38. Ministerio de la Presidencia – España. 2005. *Real Decreto, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines*. Madrid, España.
39. Morláns, M. 2004. *Introducción la ecología de poblaciones*. Ed. Científica Universitaria - Universidad Nacional de Catamarca.
40. Nail, D. & McKay, D. 2003. *Guidelines on; laboratory animal facilities-characteristics, desing and development*. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, Canada.
41. Nasir, P. 1988. *British Freshwater Cercarie*. Universidad del Oriente. Cumana. Edo Sucre, Venezuela.
42. Olazabal, E., Morales, A., Serrano, P. & Brito, E. 1999. *Obtención de metacercarias de F. hepatica en Lymnaea cubensis y relación parásito hospedero en ratas Wistar y ratones Balb/c*. Revista Veterinaria de México, 30 (1) pp 102-109.
43. Ordoñez, D. 2009. *Fasciolosis crónica avanzada: análisis del desarrollo del parásito adulto y de la oviposición en el modelo experimental Wistar*. Tesis Doctoral presentada en el Departamento de Biología Celular i Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, España.
44. Patti, A., Hochberg, R. & Litvaitis M. 2008. *Taxonomy and Evolution of the Chaetogaster limnaei Complex (Annelida: Oligochaeta)* University of Massachusetts Lowell, EEUU.
45. Pointier, J. P. 2011. *Curso de Malacología*. Université de Perpignan. Perrpignan, France.
46. Prepelitchi, L.; Kleiman, F.; Pietrokovsky, SM.; Moriena, RA; Racioppi, O.; Alvarez, J. & Wisnivesky-Colli, C. 2003. *First Report of Lymnaea columella Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) Naturally Infected with F. hepatica (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina.*, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(7).
47. Prepelitchi, L. 2009. *Ecoepidemiología de Fasciola hepatica (Trematoda, Digenea) en el Norte de la Provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de Lymnaea columella (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como*

- hospedador intermediario*, Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas. Argentina.
48. Preveraud-Sindou, M, Dreyfuss, G. & Rondelaud, D. 1994. *Comparison of the migration of F. hepatica sporocysts in Lymnaea truncatula and other related snail families*. Parasitology Research 80, 342-345.
 49. Quiroz, H. 2003. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Limusa, España.
 50. Rajasekariah, G. 1978. *Chaetogaster limnaei K von Baer 1872 on Lymnaea tomentosa: ingestion of F. hepatica cercariae*. Switzerland. Experientia 34(11): 1458-1459.
 51. Rim, HJ. Farag, HF., Sornmani, S. & Cross JH. 1994. *Food-borne trematodes: ignored or emerging?* Parasitol. Today, 10: 207-209.
 52. Roberts, J.A. & Suhardono. 1996. *Approaches to control fasciolosis in ruminants*. Internacional Journal for Parasitology 26, 971-981.
 53. Rodgers, J., Sandland, G., Joyce, S. & Minchella, D. 2005. *Multi-species interactions among a commensal (Chaetogaster limnaei limnaei), a parasite (Schistosoma mansoni), and an aquatic snail host (Biomphalaria glabrata)*. United States. J Parasitol 91(3): 709-712.
 54. Rodríguez, E., Morales, G., Pino, L & Perdomo, L. 1987. *Estadísticas vitales de Lymnaea columella (say, 1817) en condiciones de laboratorio (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora , Lymnaeidae)*. Acta Científica Venezolana, 38:465 – 473.
 55. Rojo, F. & Ferre, I. 1999. *Parasitosis hepática en Parasitología Veterinaria* Ed. Mc Graw-Hill Interamericana Madrid.
 56. Rondelaud, D. & D. Barthe .1987. *F. hepatica L.: the productivity of a sporocyst as a function of the size of Lymnaea truncatula Muller*. German West. Parasitol Res 74(2): 155-160.
 57. Sanchez, R., Perera, G., & Sanchez, J. 1995. *Cultivo de Fossaria cubensis (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedero intermediario de F. hepatica (Linnaeus) en Cuba*. Rev Cubana Med Trop, vol.47, n.1, pp. 71-73.

58. Sharp, P. E. & La Regina M. C. 1998. *The laboratory Rat* Ed. In Chief. CRC Pres, Boca Raton, EEUU Sunamo H., Ocampo L. 2003. *Farmacología veterinaria*. 2° ed. MacGraw-Hill Interamericana, México.
59. Storer, T., Usigner, R., Estebbins R. & Nybakken J. 2003. *Zoología general*. Ed. McGraw-Hill Book Company, Nueva York, EEUU y para la edición española Ed. Omega, S.A., Plato, 26 - 08006 Barcelona., España.
60. Thomas, A. & Leuckart, L. 1986. *Fasciolosis*, Ed. Elsevier, D. F. México.
61. Thompsom, S. N. 1997. *Physiology and biochemistry of snail-larval tremátodo interations*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 149-196.
62. Ueta M.T. 1989. *Ocorrência de infecção natural de F. hepatica Linnaeus, 1758 em Lymnaea columella Say, 1817 no vale do Paraíba, SP, Brazil*. Rev Saúde Públ; 14: 230-3.
63. Valenzuela, G. & Quintana, I. 1998. *Evolución de huevos de Fasciola hepatica en el medio ambiente en Temuco, IX Región de Chile*. *Archivos de medicina veterinaria*, vol.30, pp.109-114.
64. Valero, MA., Marcos, MD., Fons R. & Mas-coma, S., 1998.- *F. hepatica development in the experimentally infected black rat Rattus rattus*. *Parasitol. Res.*, 84: 188-194.
65. Who, 1995.- *Control of Foodborne Trematode Infections*. WHO Technical Report Series, World Health Organization, Geneva No. 849: 1-157.
66. Wilford, O. 1977. *Parasitología Animal II*. 3ra Ed. University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A.
67. Wilson, R. A. & Denison, J. 1980. *The parasitic castration and gigantism of Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research* 79, 259-260.

Internet:

1. BOOKINGBOX ORGANIZATION. Mapa Anta y Cusco. [en línea] <<http://www.bookingbox.org.uk/peru/cusco>> [consulta: 03 setiembre 2011]
2. INEI. Distrito de Ancahuasi - Anta y San Jerónimo - Cusco [en línea] <<http://www.map-peru.com/es/mapas>> [consulta: 06 setiembre 2011].
3. IOBC. Global Working Groups [en línea] <<http://www.iobc-global.org/mission.html>> [consulta: 05 octubre 2011].
4. Google (2011). Foto de satélite Huayllapampa y La Joya [en línea] <<http://earth.google.com>> [consulta: 10 octubre 2011].

Anexo 1

Tabla 28 Resumen de Antecedentes Internacionales

Autor/ Año/ País	Titulo de la investigación	Conclusión y/o resultado
Mas-Coma, S., Funatsu, R. & Bargues, M. (2001) Inglaterra	<i>Fasciola hepatica and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America.</i>	Concluyen que al parecer el período más largo para la liberación y la mayor producción de metacercarias, favorecen la transmisión de fasciolosis y pueden ser interpretadas como estrategias asociadas a la adaptación a condiciones de altura.
Sánchez, R., Pereira G. & Sánchez, J. (1995) Cuba.	<i>Cultivo de Fossaria cubensis (Pfeiffer) hospedero intermediario de Fasciola hepatica (Linnaeus) en Cuba</i>	Obtienen como resultado la disminución del tiempo generacional de los caracoles garantizando el crecimiento y reproducción de <i>F. cubensis</i> que permiten su producción masiva para investigaciones sobre fasciolosis.
Abrous, M., Rondelaud D. & Dreyffus, G. (2001) Estados Unidos.	<i>The stress of Lymnaea truncatula just before miracidial exposure with Fasciola hepatica increased the prevalence of infection</i>	Los caracoles sometidos a stress son notablemente más infectados (93-96% vs 48-50% en controles). El número de redias no mostro variación entre los grupos problema y control. Ni diferencias en la producción de cercarias.
Koie, M., Christensen, N. & Nansen, P. (1976) Alemania.	<i>Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of Fasciola hepatica</i>	Llega a tres conclusiones: (i) Menos de un minuto después del ataque al caracol, el miracidio pierde sus cilios. (ii) El miracidio en 15 minutos, gasta mucha energía contrayendo su cuerpo. (iii) El miracidio penetra el epitelio del caracol dura 15 minutos.
Bouix-Busson, D.; Rondelaud, D.	<i>Effect of the number of miracidia and age of the mollusc on the survival</i>	El porcentaje de caracoles infectados mostró un máximo en infecciones de cinco miracidios por caracol; el porcentaje de

<p>& Prevost, J. (1983) Francia.</p>	<p><i>and degree of infestation of Lymnaea glabra Muller by Fasciola hepatica</i></p>	<p>caracoles infectados incrementa en relación con el número de miracidios usados por caracol.</p>
<p>Rondelaud, D. & Barthe D. (1987). Alemania</p>	<p><i>Fasciola hepatica L.: the productivity of a sporocyst as a function of the size of Lymnaea truncatula Muller</i></p>	<p>El número de larvas por redia aumenta con el tamaño del caracol, que es siempre superior en la primera generación que en las generaciones siguientes. 65% -80% de estas redias maduras pertenecía a la primera generación y el primer grupo de la segunda generación, que producen la mayoría de cercarias.</p>
<p>Belfaiza, M., et al. (2004) Inglaterra.</p>	<p><i>Fasciola hepatica: cercarial productivity of redial generations in long-surviving Galba truncatula</i></p>	<p>El incremento en la frecuencia de la infección demostró que la calidad de la comida tiene un efecto significativo en la cantidad de redias de <i>F. hepatica</i> desarrolladas dentro de <i>G. truncatula</i>.</p>
<p>Lee, C., Cho, H. & Lee, C. (1995). Suiza.</p>	<p><i>Metacercarial production of Lymnaea viridis experimentally infected with Fasciola hepatica</i></p>	<p>Caracoles infectados por tres a cinco miracidios produjeron más metacercarias que los infectados con un solo miracidio. La producción total de metacercarias fue influenciada por la temperatura.</p>
<p>Prepelitchi, L., et al. (2003) Argentina.</p>	<p><i>First Report of Lymnaea columella Say, 1817 Naturally Infected with Fasciola hepatica in Argentina</i></p>	<p>De 500 Caracoles Examinados 44 (8,8%) presentaron infección de <i>F. hepatica</i>, identificada en base a las características morfológicas de sus cercarias y huevos y adultos desarrollados en ratas Wistar, que tuvieron un periodo pre-patente post infección de 44 – 49 días.</p>
<p>Prepelitchi, L. (2009).</p>	<p><i>Ecoepidemiología de Fasciola hepatica en el</i></p>	<p>Realizó muestreos estacionales entre la primavera de 2002 y de 2005 en un</p>

<p>Argentina.</p>	<p><i>Norte de la Provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de Lymnaea columella y su rol como hospedador intermedio</i></p>	<p>establecimiento en el norte de la Provincia de Corrientes. Colectó en total 7.851 <i>L. columella</i>. Durante los períodos húmedos se hallaron caracoles todo el año. Concluye que la dinámica de transmisión de <i>F. hepatica</i> en la zona de estudio estuvo influenciada principalmente por la disponibilidad de agua.</p>
<p>Olazabal, E., et al. (1999) Cuba.</p>	<p><i>Obtención de metacercarias de Fasciola hepatica en Lymnaea cubensis y relación parásito hospedero en ratas Wistar y ratones Balb/c</i></p>	<p>Obtiene por disección un total de 1 442 metacercarias con una media de 12,87 por hospedero. La potencia invasiva (PI) y la extensión de la invasión (EI) en las ratas fue de PI=23%; EI= 80%. Concluye que la potencia invasiva y extensión obtenida valida su uso con modelos de <i>F. hepatica</i> en ratas.</p>
<p>Ordoñez, D. (2009) España.</p>	<p><i>Fasciolosis crónica avanzada: análisis del desarrollo del parásito adulto y de la oviposición en el modelo experimental Wistar</i></p>	<p>Muestran que el “crowding effect” en ratas se manifiesta cuando las medidas corporales del trematodo adulto se aproximan a los valores máximos alcanzados en la fase de cronicidad avanzada. El pp y los hgh/adulto se muestran dependientes del nivel de infección, disminuyendo cuando la carga parasitaria aumenta. Esto significa que el número hgh tiende a desestimar la carga parasitaria.</p>
<p>Ibrahim, M. (2007). Alemania.</p>	<p><i>Population dynamics of C. limnaei in the field populations of freshwater snails and its implications as a potential regulator of trematode larvae community</i></p>	<p>Concluyen que <i>C. limnaei</i>, es simbióticamente asociado con caracoles vectores de enfermedades parasitarias, pudiendo tener implicaciones importantes en relación con el control biológico y / o cambios en la epidemiología de tremátodos.</p>

<p>Larrea, H., Rodgers, J., et al. (2005) Estados Unidos</p>	<p>Multi-species interactions among a commensal (<i>Chaetogaster limnaei</i>), a parasite (<i>Schistosoma mansoni</i>), and an aquatic snail host (<i>Biomphalaria glabrata</i>)</p>	<p>Observó que la prevalencia de la infección de <i>Schistosoma</i> fue mayor en los caracoles que carecían de los <i>C. limnaei limnaei</i> en relación con aquellos que fueron colonizados por estos comensales; indica que <i>C. limnaei limnaei</i> puede proteger al caracol hospedero de infecciones por trematodos.</p>
<p>Rajasekariah, G. (1978) Suiza.</p>	<p><i>Chaetogaster limnaei</i> K von Baer 1872 on <i>Lymnaea tomentosa</i>: ingestion of <i>Fasciola</i> <i>hepatica cercariae</i></p>	<p>Observan en el laboratorio que estos anélidos destruyen las fases larvianas de <i>F. hepatica</i>. La asociación comensal de <i>C. limnaei</i> y el caracol hospedero intermedio tiene potencial valor como medida de control contra la fasciolosis</p>

Anexo 2

Tabla 29. Resumen de Antecedentes Nacionales y Locales

Autor/Año /País	Título de la investigación	Conclusión y/o resultado
<p>Iturbe, P. & Muñiz F. (2010) Cusco, Perú.</p>	<p><i>Desarrollo de huevos de F. hepatica a partir de huevos aislados de la vesícula biliar de ovinos y vacunos, expuestos a luz y oscuridad</i></p>	<p>Constataron que la luz si influye en el tiempo de eclosión de huevos de <i>F. hepatica</i>, así como la procedencia de hospedero.</p>
<p>Londoño, P., et al. (2009). Cusco, Perú.</p>	<p><i>Presencia de caracoles lymnaeidae con formas larvianas de Fasciola hepatica en altitudes sobre los 4000msnm en la sierra sur del Perú</i></p>	<p>El porcentaje de infestación de los caracoles con las formas larvianas de <i>Fasciola hepatica</i> fue de 48, 46 y 36% a 4000-4200, 4200-4300, y 4300-4500 msnm, respectivamente, demostrando que el parásito puede sobrevivir sobre los 4000 msnm. La relación entre el nivel infectivo y altitud fue inversamente proporcional.</p>

<p>Larrea, H., et al. (2007) Lima, Perú.</p>	<p><i>Hospederos intermediarios de Fasciola hepatica en el Perú</i></p>	<p>Los índices de infección natural y experimental fueron del 12% y 28% en <i>Lymnaea columella</i> y del 27% y 70% en <i>Lymnaea viatrix</i>, respectivamente. <i>Lymnaea diaphana</i> y <i>Lymnaea cousini</i> no presentaron infección natural y no son susceptibles a la infección experimental.</p>
---	---	--

<p>Larrea, H., et al. (2007) Lima, Perú.</p>	<p><i>Hospederos intermediarios de Fasciola hepatica en el Perú</i></p>	<p>Los índices de infección natural y experimental fueron del 12% y 28% en <i>Lymnaea columella</i> y del 27% y 70% en <i>Lymnaea viatrix</i>, respectivamente. <i>Lymnaea diaphana</i> y <i>Lymnaea cousini</i> no presentaron infección natural y no son susceptibles a la infección experimental.</p>
---	---	--

Anexo 3

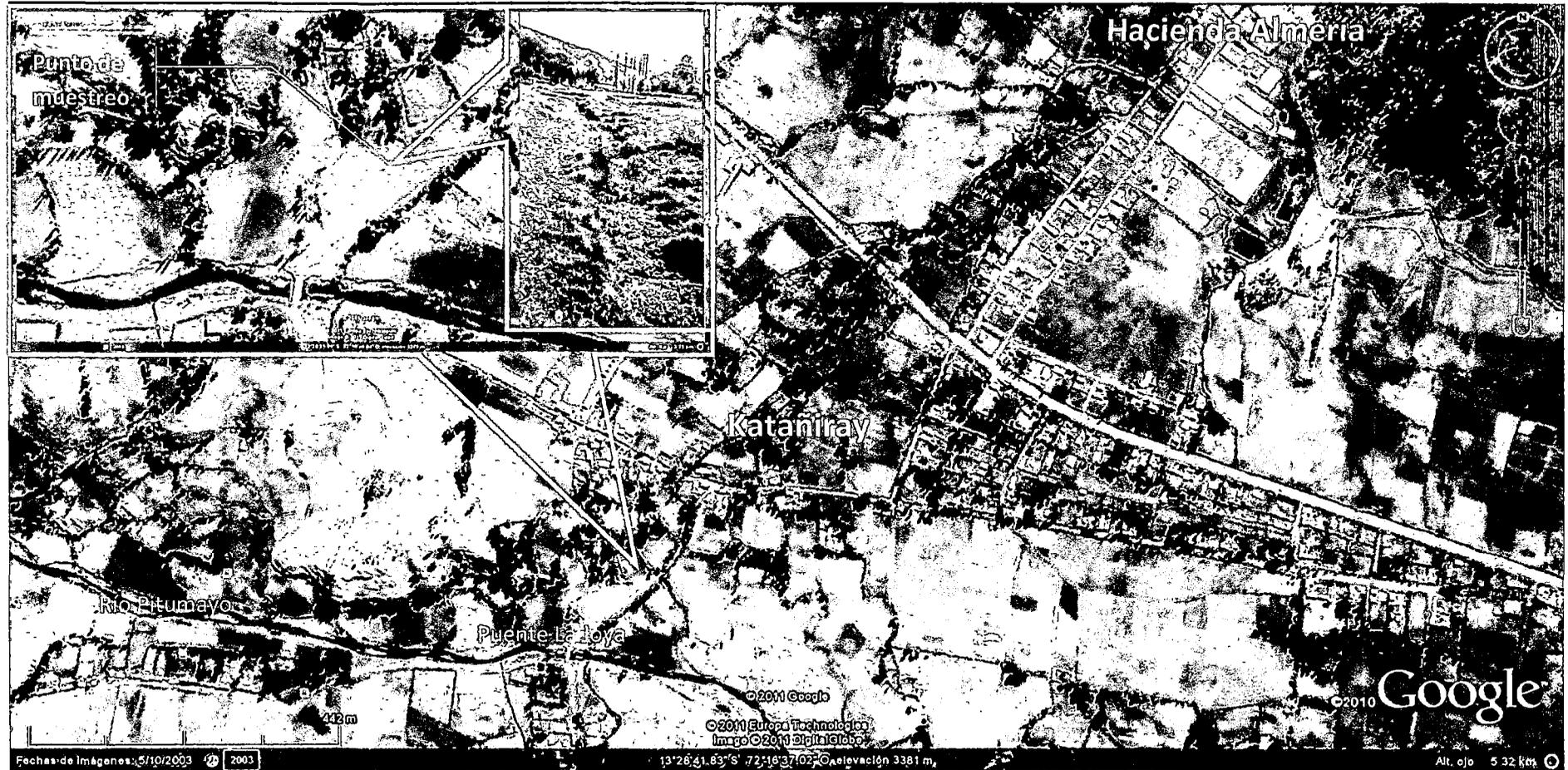
Fig. 108 Imagen satelital del punto de muestreo de caracoles en San Jerónimo



Google Earth, 2011

Anexo 4

Fig. 109 Imagen satelital del punto de muestreo de caracoles en Katañiray.



Google Earth, 2011

Anexo 5



**EPS
SEDACUSCO S.A.**

ENTIDAD MUNICIPAL PRESTADORA DE SERVICIOS DE SANEAMIENTO DEL CUSCO S.A

INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO I

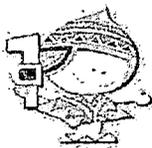
Punto de Muestreo	La Joya/ Katafiray	
Distrito/Provincia/Dpto.	Acahuasi/Anta/Cusco	
Fecha y hora de Muestreo;	12-02-11	11:30 AM
Fecha y hora de Análisis:	14-02-11	8:30 AM
Muestreado Por:	Sr. Paul Iturbe	
Fact.Nº	052-00109242-60	

Resultados Físico Químico

	MUESTRA	NORMA OMS	
Turbiedad	3,05	5,00	NTU
Color	6,00	15,00	UC
PH	7,83	6.5-8.5	
Alcalinidad Total	143,87	-	mg/lt CaCO ₃
Dureza Total	206,190	500,00	mg/lt CaCO ₃
Calcio	70,240	-	mg/lt Ca ⁺⁺
Magnesio	7,520	-	mg/lt Mg
Cloruros	23,150	250,00	mg/lt
Sulfatos	118,640	250,00	mg/lt
Sólidos Totales disueltos	218,00	-	mg/lt
Conductividad	420,00	1.500,00	uS/cm

EPS SEDACUSCO
 ENTIDAD MUNICIPAL PRESTADORA DE SERVICIOS DE SANEAMIENTO DEL CUSCO S.A.
 Ing. Jorge Luis Flores Zurita
 ESR. CONTROL DE CALIDAD FÍSICO QUÍMICO
 C. P. 10649A

Anexo 6



**EPS
SEDACUSCO S.A.**

ENTIDAD MUNICIPAL PRESTADORA DE SERVICIOS DE SANEAMIENTO DEL CUSCO S.A

INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO II

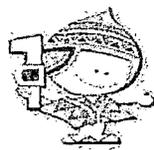
Punto de Muestreo	Huayllapampa/ San	
Distrito/Provincia/Dpto.	Jerónimo	
	San Jerónimo/Cusco	
Fecha y hora de Muestreo;	13-02-11	11:30 AM
Fecha y hora de Análisis:	14-02-11	8:30 AM
Muestreado Por:	Sr. Paul Iturbe	
Fact.N ^o	052-00109242-60	

Resultados Físico Químico

	MUESTRA	NORMA OMS	
Turbiedad	3,25	5,00	NTU
Color	6,40	15,00	UC
PH	7,67	6.5-8.5	
Alcalinidad Total	157,62	-	mg/lt CaCO ₃
Dureza Total	161,398	500,00	mg/lt CaCO ₃
Calcio	44,448	-	mg/lt Ca ⁺⁺
Magnesio	12,076	-	mg/lt Mg
Cloruros	7,281	250,00	mg/lt
Sulfatos	110,640	250,00	mg/lt
Sólidos Totales disueltos	238,00	-	mg/lt
Conductividad	470,00	1.500,00	uS/cm



Anexo 7



**EPS
SEDACUSCO S.A.**

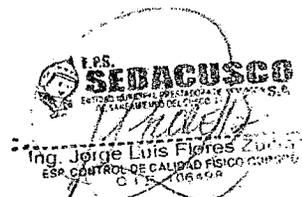
ENTIDAD MUNICIPAL PRESTADORA DE SERVICIOS DE SANEAMIENTO DEL CUSCO S.A

INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO III

Punto de Muestreo	Agua de acuario/UNSAAC	
Distrito/Provincia/Dpto.	Cusco/Cusco	
Fecha y hora de Muestreo;	14-02-11	8:00 AM
Fecha y hora de Análisis:	14-02-11	8:30 AM
Muestreado Por:	Sr. Paul Iturbe	
Fact.Nº	052-00109242-60	

Resultados Físico Químico

	MUESTRA	NORMA OMS	
Turbiedad	4,05	5,00	NTU
Color	6,70	15,00	UC
PH	7,08	6.5-8.5	
Alcalinidad Total	113,22	-	mg/lt CaCO ₃
Dureza Total	394,164	500,00	mg/lt CaCO ₃
Calcio	926,635	-	mg/lt Ca ⁺⁺
Magnesio	18,618	-	mg/lt Mg
Cloruros	2,522	250,00	mg/lt
Sulfatos	217,630	250,00	mg/lt
Solidos Totales disueltos	298,00	-	mg/lt
Conductividad	460,00	1.500,00	uS/cm



Anexo 8

Método alternativo para la administración oral en ratas

Introducción:

La administración en forma oral tanto para ratas como para ratones es traumática, y además requiere de sondas gástricas que pueden ser rígidas o blandas, con las que a veces no se cuentan en los bioterios. La alternativa a esta administración es la preparación de una gomita de gelatina con leche consistente que tiene varias aplicaciones, pudiendo usarse como vehículo de infección o drogas o en el caso más simple como aditivo a un alimento con carencias nutritivas.

Materiales:

- Gelatina light: 40 gr.
- Leche: 20 ml.
- Agua: 40 ml.
- Placa Multiwell.
- Droga o agente de infección (la utilizada para la ocasión).

Procedimiento:

- Hervir la leche en un matraz erlenmeyer previamente disuelta en agua, cuando se haya enfriado agregar la gelatina, para que no se corte la leche.
- Colocar en los recipientes correspondientes.
- Dejar solidificar de un día para el otro.

Entre las ventajas se cuentan:

- Económico (no requiere la compra de sondas).
- Práctico (no requiere entrenamiento en sujeción, ni en administración en forma oral).
- No invasivo (no hay necesidad de invadir el cuerpo del animal)
- Sin stress para el investigador
- Sin stress para los animales que puede alterar los parámetros a medir.
- Evita lesiones en el esófago en los animales, sobre todo en los más pequeños.

Autores: Graciela Dabrowski y Emiliana Herrero.

Anexo 9

Método de sedimentación rápida (TSR, MSR) (Concentración por sedimentación sin centrifugación) (Lumbreras y col. 1962)

a. Fundamento.

Se basa en la gravedad de los huevos que, por su tamaño y peso sedimentan rápidamente cuando se suspenden en agua.

b. Materiales

- Copa o vaso de vidrio o plástico, cónico de 150 a 200 mL.
- Coladera de malla metálica o plástico.
- Placas petri o lunas de reloj.
- Aplicador de madera (1/3 de bajalengua).
- Pipeta Pasteur.
- Agua corriente.
- Microscopio.

c. Procedimiento

- Homogeneizar 3 a 6 g de heces con unos 10 a 20 mL de agua filtrada
- Colocar la coladera y a través de ella, filtrar la muestra.
- Retirar la coladera y llenar la copa con agua filtrada hasta 1 cm. debajo del borde, esto es 15 a 20 veces el volumen de la muestra.
- Dejar sedimentar la muestra durante 30 minutos.
- Decantar las 2/3 partes del contenido del vaso y agregar nuevamente agua.
- Repetir los pasos anteriores cada 5 a 10 minutos por 3 a 4 veces, hasta que el sobrenadante quede limpio.
- Transferir el sedimento a una placa petri o luna de reloj, por incorporación o con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Observar al M. estereoscópico o microscopio, a menor aumento.

d. Observación

Observar la presencia de huevos. Este método es especialmente útil para la búsqueda de *Fasciola hepatica*, *Paragonimus sp.* y nemátodos como *Ascaris lumbricoides* (huevo fecundado o no fecundado), *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Diphyllobothrium pacificum*, etc.

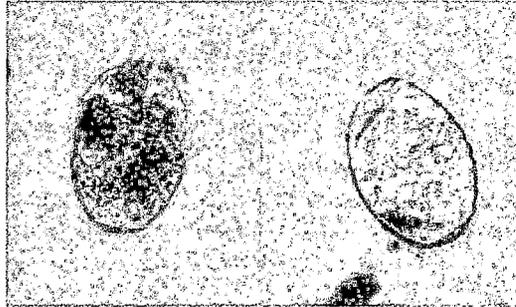


Fig. 110 Huevos opérculados de *Paragonimus peruvianus* (izq.) y *Fasciola hepatica* (der.) en muestra fresca

e. Resultado.

Informar de la presencia de huevos o larvas de parásitos. Los resultados indicarán el(los) método(s) empleado(s), el género o la especie del parásito observado y su estadio evolutivo. La densidad parasitaria puede expresarse como el número de formas parasitarias observadas por campo de microscopio con objetivo de 10X y 40X.

Anexo 10

Tabla 32 Volúmenes de sedimentos fecales (en mL) de ratas inoculadas con metacercarias de *F. hepatica* procedente de La Joya y Huayllapampa

Día pos-infección	Grupo A. <i>F. hepatica</i> procedente de la Joya			Grupo B. <i>F. hepatica</i> procedente de San Jerónimo		
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 1	Rata 2	Rata 3
86	6,6	6,5	6,5	6,5	6	10
87	5,7	3,7	3	4	3,9	3,1
88	3,5	3,2	5	2,9	2,5	2,7
89	2,5	4,6	3,8	3,2	3,1	3,1
90	4,2	4,6	4,5	3,9	4,2	4,3
91	5,8	2,2	3,9	2	2,5	3
92	5,2	4,9	4,5	4,5	6	4,8
93	2,2	2,5	2,9	2,2	2,2	3
94	3,2	4,1	3,6	6	2,9	4,1
95	3,6	4,4	4,2	4,1	3,5	4,1
96	6	4,1	5,5	5	4,5	6
97	4,3	4,2	4,2	3,8	4	4,2
98	5,1	5,5	4	4,2	6	4
99	5,2	4,8	4,1	4,3	4,1	4,2
100	4,3	4,2	4,2	3,8	4,2	4,4
Promedio	4,49	4,23	4,26	4,03	3,97	4,33

Anexo 11

Tabla 31 Número de huevos de *F. hepatica* encontrados en 0,2 mL de sedimento fecal de ratas inoculadas con *F. hepatica* procedente de La Joya (Anta) y Huayllapampa (San Jerónimo)

Día pos- infección	Grupo A. <i>F. hepatica</i> procedente de La Joya			Grupo B. <i>F. hepatica</i> procedente de Huayllapampa		
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 1	Rata 2	Rata 3
86	0	25	44	14	0	0
87	0	50	76	32	10	0
88	0	52	108	36	28	0
89	0	56	130	112	124	0
90	0	40	150	124	55	0
91	0	38	84	51	87	0
92	0	20	226	112	20	0
93	0	84	181	128	24	0
94	0	89	256	322	28	0
95	0	63	236	214	25	0
96	0	14	168	176	40	0
97	0	37	152	120	58	0
98	0	90	162	156	29	0
99	0	12	161	64	228	0
100	0	50	156	122	64	0
Promedio	0	48,00	152,67	118,87	54,67	0