

9273

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

INFECCION EXPERIMENTAL DE Pomacea flagellata (GASTROPODA:
AMPULLARIIDAE) CON Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA:
ANGIOSTRONGYLIDAE).

ANA CRISTINA BRICEÑO LOBO

Memoria de la Práctica Dirigida para optar por el grado de

LICENCIADA EN BIOLOGIA

"CUIDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO"

1986

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

INFECCION EXPERIMENTAL DE Pomacea flagellata (GASTROPODA:
AMPULLARIIDAE) CON Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA:
ANGIOSTRONGYLIDAE).

ANA CRISTINA BRICEÑO LOBO

Memoria de la Práctica Dirigida para optar por el grado de

LICENCIADA EN BIOLOGIA

"CUIDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO"

1986



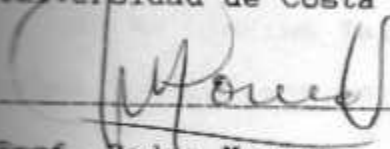
INFECCION EXPERIMENTAL DE Pomacea flagellata
(AMPULLARIIDAE) CON Angiostrongylus
(NEMATODA: ANGIOSTRONGYLIDA)

ANA CRISTINA BRICENO LOBO

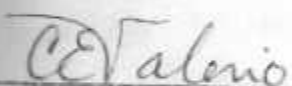
MEMORIA DE PRACTICA DIRIGIDA
Presentada a la Escuela de Biología como requisito parcial
para optar al grado de LICENCIADA EN BIOLOGIA


Prof. Hernan Camacho Vindas
Universidad de Costa Rica

Director de Práctica


Prof. Pedro Morera
Universidad de Costa Rica

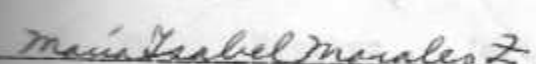
Co-Director de Práctica


Prof. Carlos Valerio
Universidad de Costa Rica

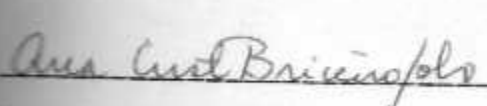
Miembro del Tribunal


Prof. Carlos Villalobos
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal


Prof. Maria Isabel Morales
Universidad de Costa Rica

Sub-Directora de la Escuela


Ana Cristina Briceño Lobo

Sustentante

AGRADECIMIENTO

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento al Lic. Hernán Cezacho y al Dr. Pedro Morera, Director y Co-Director por sus valiosos consejos y ayuda en la realización del mismo.

Al Dr. Carlos Valerio, Msc. Carlos Villalobos y a Msc. María Isabel Morales por su colaboración en la revisión del manuscrito

A la Lic. Marta Conejo por su asesoría en la realización de este trabajo

A mis compañeros Lidia Hernández, Jorge Muñoz, Julio Arias y Daniel Briceño.

A Nelly Vasquez y Ethel Sánchez por el revelado de las fotografías

A Mario Sánchez, Javier Cob y Arnoldo Barquero por su desinteresada ayuda.

INTRODUCCION

El género Angiostrongylus (Nematoda: Angiostrongyliidae) Emensky, 1905 posee las siguientes especies: : A. vasorum (Baillet, 1866), A. tateronae (Baylis, 1928) A. ondatrae (Schultz., Orlov., Kutass, 1933), A. cantonensis (Chen, 1936), A. gubernaculatus (Dougherty, 1946), A. soricis (Soltys, 1953), A. blarini (Ogren, 1954), A. chabaudi (Biocca, 1957) A. sciuri (Merdinenci, 1965), A. michaganensis (Ash, 1967) A. sandarsae (Alicata, 1968), A. mackerrasae (Bhaibulaya, 1968); A. dujardini (Drozdz y Doby, 1970), A. schmidtii (Kinsella, 1971), A. costaricensis (Morera y Cespedes 1971), A. minutus (Ohbayashi et al, 1973), A. malaysiensis (Kinsella, 1977), A. siamensis (Ohbayashi., et al, 1979).

De las especies mencionadas solamente, dos causan enfermedad en el hombre : A. cantonensis y A. costaricensis . La primera especie produce una meningo-encefalitis . En seres humanos la enfermedad se produce cuando los estadios juveniles del parásito migran al cerebro y mueren produciendo una reacción inflamatoria (Alicata y Jindrak, 1970). Esta enfermedad se ha encontrado en países de la Cuenca Oriental del Pacífico Sur , las Islas Hawaii, el Pacífico Sur y en el Continente Americano (Aguiar et al, 1981).

Los parásitos adultos de A. costaricensis viven especialmente en las arterias mesentéricas de la región ileocecal. Los vermes

presentan cuerpo filiforme, de cutícula transparente con estriaciones finas que se van engrosando hacia los extremos. La extremidad caudal está curvada ventralmente en ambos sexos. El poro excretor está ligeramente posterior a la unión del esófago con el intestino. El esófago se ensancha en la parte posterior, donde se localiza el anillo nervioso. La extremidad cefálica es redondeada y tiene una abertura oral provista de tres pequeños labios.

El macho mide de 17.4 a 22.0 mm de largo ($\bar{X}=19.9$ mm). Los testículos son posteriores a la unión del esófago con el intestino. Las espículas delgadas, estriadas e iguales. El gobernáculo está formado por dos ramas que se unen antes de llegar a la cloaca. La bolsa copulatrix es simétrica y medianamente desarrollada; presenta rayos ventrales fusionados, excepto en su extremidad distal donde se puede observar que el ventro-lateral es ligeramente más largo que el ventro-ventral. Los rayos laterales emergen de un tronco común y están bien separados de los ventro-laterales; el externo-dorsal nace cerca del tronco lateral y termina en una estructura piriforme; el dorsal es corto y bifurcado. La cloaca tiene forma de media luna, con tres papilas en su abertura, con la convexidad hacia el extremo caudal.

La hembra mide entre 28.2 y 42.0 mm ($\bar{X}=32.8$). El esófago es ligeramente más grande que en el macho. La extremidad caudal es cónica con una proyección en la punta. El ano se encuentra entre 0.050 y a 0.065 mm del extremo de la cola y la vulva de 0.24 a

0.29 de la cola. El tubo uterino sale por detrás de la unión del esfago con el intestino y continúa hacia el extremo posterior.

El ciclo de A. costaricensis (Morera, 1973) es el siguiente: una vez fecundadas las hembras, ovipositan y los huevecillos son arrastrados por la corriente sanguínea hasta la pared intestinal donde quedan atrapados en los vasos de menor calibre. En el tejido, los huevecillos embrionan en un periodo de 4 días. Las larvas de primer estadio (L1) son muy activas, miden entre 0.26 y 0.29 mm de largo por 14 a 15 micras de ancho; la cola es afilada y presenta una muesca cerca de la punta sobre el lado dorsal. Estas larvas son eliminadas diariamente en la materia fecal de la rata infectada.

En Costa Rica los hospedes intermediarios más importantes son babosas de la familia Veronicellidae. Además, tres especies de planorbidos, Helisoma trivolvis, Biomphalaria straminea (Camacho, 1979) y B. glabrata (Morera, 1986 com. pers.) se han infectado experimentalmente. La babosa se infecta al ingerir las larvas (L1) con las heces de la rata. Una vez en el estómago del gastrópodo, migran al intestino y se introducen en los tejidos fibromusculares del pie y del manto. Aquí la larva se inmoviliza y cambia de morfología; aparece muy engrosada y llena de gránulos alimenticios. Entre el tercero y el cuarto día se produce la primera muda. La larva de segundo estadio (L2) madura mide un promedio de 0.370 mm y es granulosa e inmóvil. La segunda muda

ocurre entre el décimo primero y décimo tercer días, y se forma la larva de tercer estadio (L3); conforme madura va perdiendo los gránulos y las envolturas de las primeras mudas. Al día 18 después de la infección se transforma ya en la forma infectante, se observa con claridad los órganos internos, cuando es liberada la larva L3 se torna muy activa y mide entre 0.4 y 0.5 mm de largo ($\bar{X}=0.472$). El esófago mide 0.164 mm. El intestino es tabular y el ano está a 0.32 micras de la punta de la cola. El anillo nervioso está a 64 micras y el poro excretor a 84 micras del final cefálico. El primordio genital está a 0.164 mm de la punta de la cola.

Cuando el roedor ingiere las L3 las larvas descienden hacia el intestino y penetran en la pared de este a nivel del ileón; una vez en la pared intestinal, se introducen en los vasos y ganglios linfáticos de la cavidad abdominal. La tercera muda ocurre entre el segundo y tercer día. En las larvas de cuarto estadio (L4) se observa diferenciación sexual, en los machos se puede ver un abultamiento en la extremidad caudal, lo que dará origen a la bolsa copulatrix. La última muda se produce entre el sétimo y el décimo día, y el estadio L5 o adultos jóvenes miden 2 mm. Estos rompen la pared de los vasos linfáticos, migran por el tejido conjuntivo laxo del mesenterio hacia las arteriolas su habitat definitivo. El período prepatente es de 24 días y la madurez somática de los vermes ocurre alrededor de los 40 días.

Después de la infección.

En Costa Rica se ha encontrado infección natural en las siguientes especies de roedores : Sigmodon hispidus, Peromyscus nudipes, Tylomys watsoni, Oryzomys albigularis, O. caliginosus (Cricetidae), Rattus rattus, R. norvegicus (Muridae), Thomomys salvini (Heteromyidae), Proechimys semispinosus, (Echimyidae) (Morera, 1984) y en Panamá: L. adpersus, O. fulvescens, Zigodontomys microtinus (Cricetidae) (Tesh, et al 1973).

También se ha encontrado el parásito en pizotes (Nasua narica bullata) (Carnivora: Procyonidae) (Monge et al., 1978) marmosetas (Leontideus mystax) (Primates: Callithricidae) (Sly et al., 1982).

Cuando las hembras ovipositan en las arterias mesentéricas en el hombre, los huevecillos quedan atrapados en los vasos de menor calibre, y como se mencionó, causan una reacción inflamatoria que generalmente es de tipo granulomatosa, con infiltración eosinofílica. Los parásitos adultos en las arterias pueden causar lesiones del endotelio que causan coágulos y luego se organizan en trombos. Cuando estos son oclusivos se produce anoxia, necrosis, perforaciones y peritonitis (Conejo, 1985).

La enfermedad que este parásito produce en el hombre se llama angiostrongiliasis abdominal (Morera y Cespedes, 1971), las lesiones más frecuentes se producen en la parte terminal de ileum, apéndice, cecum y colon ascendente. Generalmente los pa-

cientos se quejan de dolor abdominal localizado en la fosa iliaca derecha o flanco del mismo lado; además se puede presentar vómito, diarrea y rigidez abdominal. Casi siempre hay fiebre y el hemograma muestra leucocitosis y eosinofilia elevadas (Robles et al, 1968., Loria y Lobo, 1980).

Además de las lesiones intestinales, se han observado localizaciones ectópicas en el hígado (Morera et al, 1982) y testículo (Gait y Morera, 1983).

La subclase Prosobranchiata del phylum Mollusca abarca aquellos gastrópodos que se caracterizan por tener una branquia localizada en la parte anterior al corazón. La concha generalmente tiene un opérculo calcáreo o córneo. La respiración es a través de las branquias (excepto en los caracoles terrestres) y los sexos están separados, la mayoría son ovíparos y pocos ovovivíparos; los huevos están agrupados usualmente en cápsulas.

La subclase se divide en tres órdenes a saber, Archeogastropoda: son los prosobranquios más primitivos, todos marinos, y herbívoros; cada caracol contiene dos aurículas, dos branquias, dos hileras de lamelas; Mesogastropoda: este orden incluye la mayoría de los prosobranquios que poseen una aurícula, una branquia que tiene forma de peine y una sola fila de lamelas; Neogastropoda: este orden comprende caracoles marinos; la morfología general del cuerpo es similar a los Mesogastropoda, pero sus miembros se caracterizan por tener de 1

Libellula
Pomacea

a 3 filas transversales de dientes radulares .

Los caracoles de la familia Ampullariidae (=Pilidae) que pertenecen al orden Mesogastropoda , poseen estructuras respiratorias anfibias; una parte de la cavidad del manto contiene una branquia y la otra parte se convirtió en una cavidad pulmonar. Son animales ovíparos con ojos cortos situados en pedúnculos en la base de los tentáculos que son largos y filiformes (Maleck y Cheng, 1974).

Entre los prosobranquios anfibios hay varios géneros de la familia Ampullariidae : Lanistes Montfort, 1810 (en África) ; Marisa Gray, 1824 (en América del Sur); Pila Roding, 1798 (en África y Asia); Pomacea Perry 1811 (en Centro y Sur América , en el Sur de los Estados Unidos y las Islas del Caribe) (Maleck, 1980); Afropamus Pilsbury y Bequaert; Saulea Gray y Saulea D'Orbigny (Maleck y Cheng, 1974).

La concha de Pomacea es más o menos globosa, con un peristoma verde o pardo, el opérculo es concéntrico y córneo. los huecos son redondos con una abertura calcificada coloreada, rosada (P. flagellata), escarlata o verde (P. maculata). Estos colores varían conforme se va desarrollando son depositados en racimos en las plantas acuáticas (Martens, 1901).

Algunas especies de este género son depredados por pájaros como Aramus guarauna y Rosthramus sociabilis en Costa Rica (Collet, 1975); por peces como Lepidoserena paradoxa en Perú (Tovar

et al., 1973); por tortugas y lagartos jóvenes en Florida (Chelonia serpentina y Alligator mississippiensis). También se ha informado de insectos depredadores de los huevos (Snyder y Snyder, 1971., Kushland, 1978).

Algunas especies de este género como P. maculata habitan en quebradas, lagunas, estanques, campos de arroz, zanjas de irrigación y drenaje; durante la estación seca se inactivan (Neyra, 1978).

Del género Pomacea se han aislado bacterias patógenas como Salmonella spp, Pseudomonas aeruginosa y Edwardsiella tarda, y se cree que este caracol pueda ser responsable de casos de salmonelosis en los Estados Unidos (Bartlett y Trust, 1976). También se han encontrado varios trematodos para especies de estos caracoles: así en P. glauca se han informado Echinostomos cercarias: Cercaria paraudoi Nasir, Díaz y Hamana, 1969; Echinostochasmus rubedakhaname Nasir y Díaz, 1968; y Stephanoprora paradenticulata Nasir y Rodríguez, 1969. Furcocercaria: Cercaria heteroglandula Nasir y Díaz, 1969. Gymnocephalous cercaria: Cercaria barceloica Nasir, 1971; C. pomacea Nasir y Díaz, 1968; C. sanlorenzensis Nasir y Díaz, 1968; Samolcaipuria pseudoconcilia (= Cercaria pseudoncilia Díaz y Guevara, 1969) C. pliegicauda Nasir., Díaz, 1973. Macrocerus cercaria: Cercaria latigazica; C. yacalicola Nasir., Díaz., Hamana y Guevara, 1969; Xiphidiocercarias: Cercaria arismendii

Nasir., Hamana y Diaz, 1969; C. etgesis Nasir, 1964; C. peculiaristylata Nasir y Acuña, 1966; C. pifanoi Nasir y Diaz, 1967; C. guanipensis Nasir y Diaz, 1973; C. farakhanweri Nasir y Diaz, 1971.

De las especies de cercarias mencionadas anteriormente, las del tipo equinostoma (que generalmente son parásitos de pájaros y mamíferos) ocasionalmente parasitan al hombre (Maleck y Cheng, 1974). Lo mismo se ha informado por cercarias parásitas de P. paludosa (Hanning y Leedmon, 1976). La enfermedad que producen en el hombre es una dermatitis que se produce cuando el ser humano se convierte en un huésped accidental de cercarias de esquistosomas no humanos ; la cercaria penetra la piel, donde muere causando una reacción de hipersensibilidad (Hoffler, 1974).

Otro ampulárido, Pila luzoica, actúa como huésped intermedio de Echinostoma ilocanum , que parasita al hombre en varias partes del mundo (Bonne et al., 1953).

Varias especies de ampuláridos se han encontrado naturalmente infectados de A. cantonensis : Pila scutata (Lim., et al , 1965), P. gracilis, P. polita, P. turbinis y P. ampullacea (Harinasuta et al., 1965). Esta última especie es usada como alimento en Tailandia y se considera que es la causante de la mayor parte de los casos de infecciones humanas en este país; aquí el género Pila se considera el huésped de agua dulce mas

importante de A. cantonensis (Lim y Ramachandran ,1977). P. scutata es el hospedero intermediario de A. malasyensis que se presume puede ser también agente causal de casos de meningo-encefalitis eosinofílica. Este caracol es consumido por los habitantes de Malasia que provee un suplemento proteínico a la población, especialmente a los grupos de bajos ingresos de las áreas rurales (Lim et al, 1978).

También P. paludosa se encontró naturalmente infectada por A. cantonensis en Cuba (Aguiar et al, 1981) y en las Islas Oahu, Hawaii, donde esta especie empezó a ser cultivada para consumo alimenticio y como mascota en los acuarios (Wallace y Rosen, 1969b).

La biología de P. flagellata es poco conocida. La biometría (Goto, 1986. com.pers.) y su crecimiento (Muñoz, 1986. com.pers.) están siendo estudiadas en la actualidad. Esta especie junto con P. costarricana se está cultivando experimentalmente en la Estación Enrique Jiménez Núñez en Taboga, Canas Provincia de Guanacaste. La primera especie fue colectada por Morrison en Panamá en 1944 y descrita por el mismo en 1946.

P. flagellata posee una concha de tamaño mediano, globosa, estrechamente umbilicada y moderadamente sólida. La superficie varía de opaca a brillante con líneas de crecimiento y ornamentaciones microscópicas en la superficie de la concha, corneas con bandas espirales subequidistantes y subiguales de color caoba.

MATERIAL Y METODOS

Las espiras son redondeadas y separadas por una sutura moderada. La espira del cuerpo es un poco más redondeada hacia arriba que hacia abajo. Las espiras miden aproximadamente un tercio del largo de la concha. La abertura es grande, ovalada o semicircular, algo expandida hacia abajo. El labio columenar se observa bien redondeado dentro de la curva basal (Morrison, 1946).

Debido a que *P. flagellata* se introdujo en Costa Rica con el propósito de ser utilizada para el consumo humano, este trabajo intenta determinar la susceptibilidad de esta especie a la infección con *A. costaricensis*, por las eventuales implicaciones en la transmisión de este nematodo.

A. costaricensis se obtuvo de heces de ratas de la zona de San José, previamente infectadas, mantenidas en el laboratorio de Parasitología del Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios.

El trabajo se divide en dos partes.

Primera parte

Inicialmente se procedió a la infección de ejemplares de *P. flagellata* con larvas L1 de *A. costaricensis*. Se determinó el tiempo en que ocurrieron cambios larvales a L2 y L3 y a L4 y L5. También se cuantificó el número de larvas en cada estadio y el número de larvas de tercer estadio alcanzadas.

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se efectuó en el laboratorio de Parasitología del Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios (San José, Costa Rica), del 23 de julio de 1985 al 3 de febrero de 1986.

Los ejemplares de Pomacea flagellata se colectaron en los estanques de Acuacultura de la Estación Enrique Jiménez Núñez (Ministerio de Agricultura de Costa Rica) en Cañas, provincia de Guanacaste, el 27 de julio y el 22 de noviembre de 1985.

En el laboratorio, los caracoles se mantuvieron en acuarios con agua decolorada, a temperaturas entre los 25 y 27 grados centígrados y se alimentaron con hojas de repollo y lechuga.

Las larvas de primer estadio (L1) de Angiostrongylus costaricensis se obtuvieron de heces de ratas de milpa Sigmodon hispidus previamente infectadas, mantenidas en el bioterio del laboratorio de Parasitología del Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios.

El trabajo se dividió en cuatro partes:

Primera parte

Inicialmente se procedió a la infección de ejemplares de P. flagellata con larvas L1 de A. costaricensis. Se determinaron los días en que ocurrieron cambios larvales de L1 a L2 y a L3 en el caracol. También se cuantificó el número de larvas en cada estado y si las larvas de tercer estadio alcanzaban el estado

adulto, al ser inoculadas en ratas de milpa. Para la infección se colocaron 4 grupos de 10 caracoles, cuyo largo de la concha osciló entre 0.94 y 1.48 cm en sendas bandejas plásticas de 7.40 altura x 15.5 largo y 12.0 cm de ancho. Se agregó agua a 25-27 grados centígrados y se cubrieron con una malla fina de cedazo. Además se usó una fuente de aireación. El día anterior a la infección (la cual se efectuó durante tres días consecutivos), se retiró la comida a los caracoles. Cada día de infección se agregaron las larvas L1; estas fueron obtenidas utilizando el método de Baermann (1917) y se usaron dosis de 400 L1/caracol (4,000 larvas/bandeja). Las dosis se obtuvieron contando el número de larvas contenidas en 1cc de líquido del aparato de Baermann usando una caja de Petri cuadrículada de 5cm. Durante el período de exposición las bandejas se dejaron con poca agua, de modo que cubriera 1/3 del tamaño de los caracoles. Ocho horas después se agregó agua a las bandejas hasta que esta cubriera completamente a los moluscos. Después del período de exposición a los caracoles se les ofreció alimento en forma regular.

Para observar el desarrollo larvario se utilizó el método de Wallace y Rosen (1969) y Baermann (1917). El caracol se abrió presionando la concha entre dos láminas de vidrio grueso. Los tejidos blandos del molusco se cortaron en pequeños pedazos; estos se colocaron en una solución que contenía 5g de pepsina, 1ml de HCl en 1,000 ml de agua para ser licuados. Se usó parte de

esta misma solución en una pizeta para lavar los restos de la concha quebrada, los vidrios y los instrumentos utilizados para cortar el molusco. El producto del lavado también se colocó en la licuadora. Se accionó la licuadora a máxima velocidad por 1 minuto hasta que no se observaron pedazos grandes de tejido. El licuado se vació en frascos erlemeyer de 250 ml. Las paredes y las aspas de la licuadora se lavaron con la solución de pepsina. El producto del lavado se agregó a los erlemeyer y se colocaron en una estufa a 37 grados centígrados durante 1 a 3 horas. Después de la digestión el contenido de cada frasco se colocó en un aparato de Baermann, según la técnica descrita por Wallace y Rosen (1969c) y se dejó durante toda la noche. Al día siguiente se recogieron 10cc de líquido del fondo del embudo y se colocaron en una caja de Petri cuadrículada de 5 cm de diámetro. La tinción y el conteo de larvas se hizo observando cada cuadrado en el microscopio estereoscópico a 24 aumentos. Para la identificación del estadio larvario se montaron las larvas en portaobjetos y se observaron al microscopio de luz.

Para comprobar la infección e identificar el estadio larvario se digirieron 3 caracoles de cada bandeja al sexto, decimotercero y vigésimo sexto día posterior al último día de infección. Para los primeros dos casos se sacrificaron 3 caracoles/bandeja y para el último caso el número de caracoles sobrevivientes en cada bandeja. Si algún caracol moría fuera de los días señalados para

La digestión, este era digerido inmediatamente. A cada caracol digerido se le tomaron medidas de largo y ancho de la concha, y largo de la espira con un calibre de precisión.

Sesenta L3 maduras fueron inoculadas con una sonda gástrica a una rata de milpa. La presencia de larvas L1 se verificó en las heces de la rata 24 días después de la inoculación. Veinticinco días después se sacrificó la rata, y se buscaron los adultos en las arterias mesentéricas, especialmente en la región ileocecal, los parásitos se extrajeron, se fijaron en AFA y se identificaron.

Una vez que se comprobó la susceptibilidad a la infección de E. flabellata se desarrollaron los siguientes tres ensayos:

Segunda Parte:

En la segunda parte se procedió a evaluar la infección a diferentes dosis: 200, 400, 600 y 800 L1/caracol por 72 horas de exposición. Para esto se utilizaron 4 grupos de 10 caracoles. El tamaño de estos osciló entre 0.93 y 2.43 cm de largo.

La exposición a las L1 en este ensayo, así como en la tercera y cuarta partes, se efectuó siguiendo el mismo procedimiento que aquel utilizado para determinar la susceptibilidad a la infección. Los días establecidos para la observación del desarrollo larvario en la primera parte se continuaron igual en el resto de los ensayos.

Tercera parte:

En la tercera parte se procedió a exponer 3 grupos de 10 caracoles a una dosis de 400 Li/caracol, a un grupo durante 24 horas y los dos restantes por 48 y 72 horas respectivamente. El tamaño de los moluscos osciló entre 1.23 y 2.65 cm de largo. Este ensayo se repitió con tres grupos de 10 caracoles cuyo tamaño osciló entre 1.40 y 2.57 cm de largo.

Cuarta parte:

En este último ensayo se procedió a evaluar si existían diferencias en la infección en individuos de 80 días de edad y más de 80 días. Los primeros nacieron en el laboratorio y su tamaño osciló entre 0.70 y 1.30 cm de largo; los segundos se colectaron en el campo, y por su tamaño (entre los 2.26 cm y los 3.32 cm de largo) se asumió poseían una edad mayor a la de 80 días.

Los caracoles nacidos en el laboratorio se obtuvieron de masas de huevos traídas del campo; estas se colocaron en cedazos de alambre y se amarraron con hilo de nylon sobre un frasco de vidrio con agua. Una vez que eclosionaron los caracoles fueron alimentados con repollo y lechuga. Se midió el largo de la concha a los 37, 50 y 80 días de nacidos.

Se utilizaron 30 caracoles de 80 días, nacidos en el laboratorio, divididos en tres grupos de 10 caracoles/bandeja. Un grupo de estos, nació y fue mantenido en el invernadero de la Escuela

de Biología de la Universidad de Costa Rica hasta la edad de 80 días; el resto nació y se mantuvo en el laboratorio de Parasitología. Se utilizaron 30 caracoles de más de 80 días en grupos de 5 por bandeja. Se expusieron todos los grupos a 400 L1/caracol durante 72 horas.

Para determinar si existían diferencias significativas en los datos de los diferentes ensayos, se utilizó una prueba no paramétrica de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis. Para ver si existe una correlación entre el largo de la concha y el número de larvas se utilizó una correlación lineal simple.

El análisis se llevó a cabo con el programa STATGRAPHICS versión 1.0.

Para la ubicación de las larvas en los moluscos infectados, 7 caracoles se expusieron a 4000 larvas/caracol por 72 horas. Veintiseis días después fueron anestesiados con Mentol y fijados en formalina al 10%. Se tomaron muestras del pie, del manto y las vísceras y se hicieron cortes al micrótopo. Los cortes fueron de 5 micras, se tiñeron con hematoxilina-eosina, e impregnación argéntica de Laidlaw.

Para comprobar si existía infección natural en caracoles nacidos en el campo 20 caracoles fueron digeridos, y se analizaron separadamente vísceras y tejido muscular junto con el manto.

Ejemplares de los caracoles que se emplearon en este trabajo se depositaron en el Museo de Zoología de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos demuestran que Pomacea flagellata tiene cierto grado de susceptibilidad a la infección con A. costaricensis. El cuadro 1 muestra que la mayor cantidad de larvas por caracol fue de 68 y el ($\bar{X} = 6.2 \pm 12.8$). Se infectaron 25 caracoles (86.6%) de un total de 30 caracoles expuestos.

En las digestiones efectuadas el día 26 post-infección se pudo observar que la mayoría de las larvas permanecen inmóviles (Fig. 1); el promedio de L3/caracol fue de $\bar{X} = 3.0 \pm 12.3$. De las 68 L3 inoculadas en una rata de milpa se obtuvieron 3 adultos de A. costaricensis localizados en las arterias mesentéricas. Las larvas de primer estadio se observaron en las heces de la rata inoculada hasta el vigésimo octavo día.

El promedio de larvas encontradas cuando se usaron diferentes dosis de exposición (L1) fue el siguiente: 200L1 = $\bar{X}: 0.4 \pm 0.94$; 400L1 = $\bar{X}: 0.3 \pm 0.48$; 600L1 = $\bar{X}: 0.8 \pm 2.52$ y 800L1 = $\bar{X}: 3.4 \pm 5.0$ y el máximo de larvas encontradas fue de 16 (cuadro 2). La Fig 2 muestra que el número de caracoles infectados aumenta a mayores dosis de exposición. El análisis de variancia de una clasificación por rangos de Kruskal y Wallis para las diferentes dosis muestra que no hay diferencias significativas ($P > 0.05$); sin embargo la prueba aplicada a dosis de 200 y 800 L1 revela diferencias significativas ($P < 0.05$) en el total de larvas por caracol.

En cuanto al tiempo de exposición, el promedio de larvas

fue el siguiente : 24 hs= $\bar{X}:0.20 \pm 0.5$; 48 hs= $\bar{X}:0.55 \pm 1.05$ y 72 hs= $\bar{X}:0.8 \pm 1.36$ (Cuadros 4 y 5) . Como se puede observar encontraron más caracoles infectados a más horas de exposición (Fig 3). La prueba de Kruskal y Wallis indica que las diferencias en el número de larvas por caracol son significativas para los diferentes periodos de exposición ($P<0.05$).

La Fig 4 muestra que se infecta el doble de caracoles cuando tienen una edad de 80 días (Cuadro 6) que los de más de 80 días (Cuadro 7 y 8) . Las diferencias en el total de larvas por caracol observadas en estos dos grupos etarios son significativas por edad ($P<0.05$).

No se encontró presencia de infección natural por A. costaricensis (Cuadro 2 y 9) .

Una correlación lineal simple entre el largo de la concha y el número de larvas muestra un coeficiente de correlación de $r=0.21$.

En los cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina se observa que las larvas se ubican tanto en las vísceras como en el pie y en el manto. Alrededor de las larvas se observa la presencia de masas de amebocitos y muchas de aquellas muestran signos de deterioro (Fig 5 y 6) . La impregnación argéntica de Laidlaw revelan una delicada capsula de fibras reticulares alrededor de las larvas .

Cuadro 1 : Tamaño (en cm), días de infección y larvas en caracoles expuestos a 400 L1/caracol durante 72 horas. Laboratorio de Parasitología Hosp. Sn. Juan de Dios. 1985

largo *	anch **	largo***	días	L1	L2	L3	total de
concha	concha	espira	@				larvas
1.50	1.42	0.45	6	3	0	3	3
1.97	1.29	0.21	6	2	2	0	4
0.97	0.70	0.10	6	1	1	0	2
1.44	1.28	0.23	13	0	13	0	13
1.32	1.12	1.23	13	0	17	0	17
1.08	0.92	0.19	13	0	1	0	1
0.94 +	0.77	0.22	13	0	0	1	1
1.04 +	0.96	0.12	19	0	0	0	0
1.40	1.17	0.18	26	0	0	13	13
1.11	0.95	0.17	26	0	0	4	4
1.47	1.16	0.24	6	1	2	0	3
1.29	1.18	0.30	6	1	0	0	1
1.19	1.00	0.20	6	2	0	0	2
1.32	1.14	0.23	13	0	1	0	1
1.18	1.01	0.22	13	0	8	0	8
0.94	0.86	0.05	13	0	1	0	1
1.25	1.07	0.18	13	0	0	0	0
1.17	1.07	0.18	26	0	1	1	2
1.21	1.09	0.17	26	0	0	0	0
1.30	1.18	0.18	6	0	0	0	0
1.43	1.38	0.20	6	3	0	0	3
0.96	0.88	0.16	26	0	0	0	0
1.26	0.90	0.31	26	0	2	0	2
1.20	1.17	0.11	13	0	3	0	3
1.32	1.14	0.16	13	0	21	0	21
1.20	1.13	0.21	13	0	3	0	3
1.05 +	0.86	0.13	26	0	4	0	4
1.48 +	1.16	0.16	26	0	2	1	3
1.24	1.13	0.24	26	0	1	67	68
1.02	0.95	0.15	26	0	0	0	0
Total				13	83	90	186

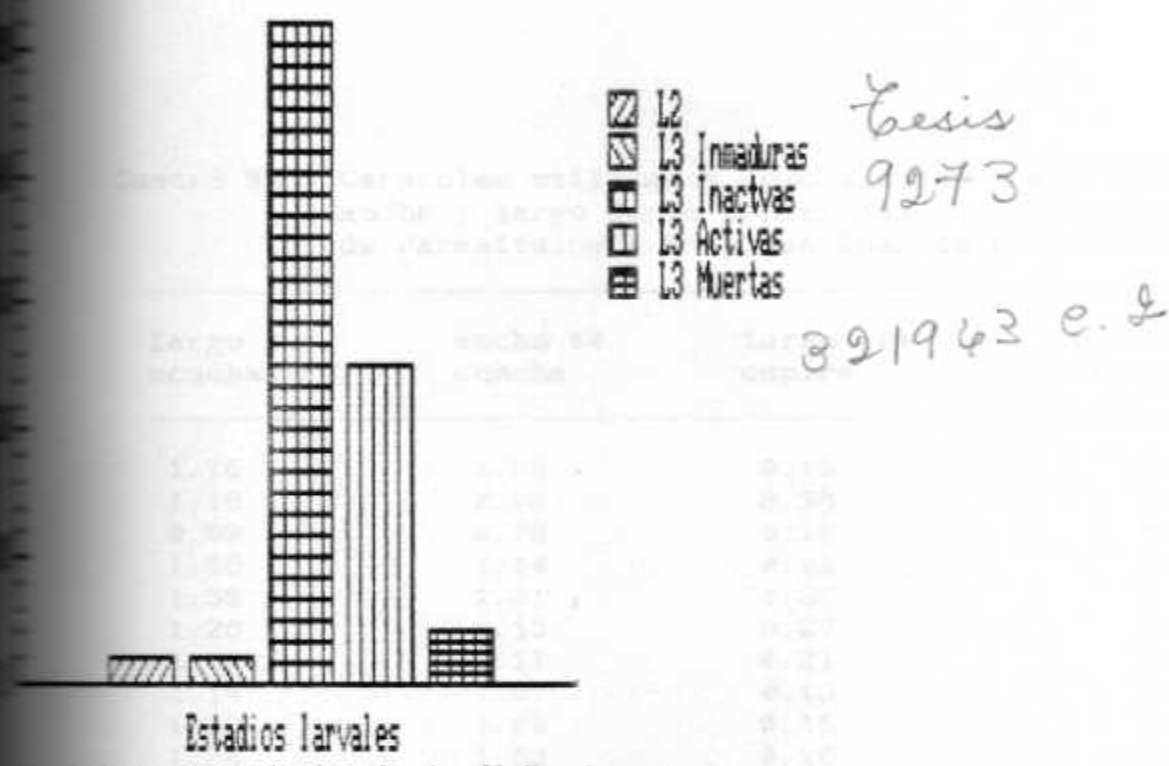
* $\bar{X}$: 1.24 $\pm$ 0.21

** $\bar{X}$: 1.07 $\pm$ 0.17

*** $\bar{X}$: 0.22 $\pm$ 0.20

+ muertos

@ número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.



Estudios larvales

de larvas y estadio larval a los 26 días después de la infección con *L. de A. costaricensis*.

Sección 2 : Datos de laboratorio de larvas de
Parasitología y de la zona de
 estudio de la zona de estudio de la zona de
 estudio de la zona de estudio de la zona de

Sección 3 : Datos de laboratorio de larvas de
 estudio de la zona de estudio de la zona de

Cuadro N2 : Caracoles utilizados como testigo segun largo,
 ancho y largo de la espira (en cm). Laboratorio
 de Parasitología. Hosp. San Juan de Dios. 1985.

largo * concha	ancho ** concha	largo *** espira	total de larvas
1.76	1.26	0.16	0
1.16	0.78	0.26	0
0.99	0.78	0.10	0
1.36	1.14	0.22	0
1.30	1.21	0.22	0
1.26	1.13	0.27	0
1.23	1.11	0.21	0
1.14	1.07	0.13	0
1.12	1.02	0.16	0
1.24	1.63	0.16	0

Cuadro 3 : Tamaño, días de infección y larvas en caracoles expuestos a 200, 400, 500 500 L1/ caracol durante 72 horas. Laboratorio de Parasitología. Hosp. San Juan de Dios. 1985

# larvas	largo *	ancho**	largo***	días	L1	L2	L3	total
	concha	concha	espira	e				larvas
200	1.55	1.41	0.12	6	3	0	0	3
200	1.69	1.47	1.10	6	0	0	0	0
200	1.16	1.03	1.09	6	0	0	0	0
200	1.48	1.25	0.27	13	0	0	0	0
200	1.23	1.11	0.14	13	0	0	0	0
200	1.62	1.46	0.27	13	0	0	0	0
200	0.93 +	0.86	0.24	13	0	0	1	1
200	0.95 +	1.73	0.31	16	0	0	0	0
200	1.63 +	1.43	0.15	19	0	0	0	0
200	1.16 +	1.07	0.25	26	0	0	0	0
400	2.13	1.86	0.33	6	0	0	0	0
400	1.84	1.67	0.17	6	0	0	0	0
400	2.21	2.06	0.41	6	1	0	0	1
400	1.91	1.76	0.45	13	0	0	0	0
400	2.25	2.08	0.51	13	0	0	0	0
400	2.02	1.81	0.22	13	0	1	0	1
400	2.43	2.25	0.45	26	0	0	0	0
400	2.18	1.99	0.32	26	0	0	0	0
400	2.13	1.87	0.35	26	0	0	1	1
400	1.50	1.40	0.24	26	0	0	0	0
500	1.83	1.65	0.26	6	0	0	0	0
500	1.71	1.58	0.28	6	0	0	0	0
500	1.01	1.00	0.19	6	0	0	0	0
500	1.96	1.32	0.27	13	0	0	0	0
500	1.86	1.69	0.44	13	0	0	0	0
500	1.61	1.49	0.36	13	0	0	0	0
500	1.71	1.41	0.31	26	0	0	0	0
500	1.91	1.71	0.39	26	0	0	0	0
500	1.67	1.51	0.26	26	0	0	0	0
500	1.96	1.66	0.14	26	0	0	0	0
500	1.66	1.63	-	6	0	0	0	0
500	1.93	1.86	0.46	6	1	-	-	3
500	1.96	1.74	0.29	6	0	7	0	7
500	2.04	1.90	0.38	13	16	0	0	16
500	1.68	1.45	0.32	13	0	0	0	0
500	1.66	1.54	0.40	13	0	0	0	0
500	1.24	1.18	0.24	26	-	-	-	2
500	1.72	1.36	0.34	26	-	-	-	1
500	1.48	1.35	0.29	26	0	4	0	4
500	1.33	1.24	0.26	26	0	3	1	4
Total					21	23	3	52

* $\bar{X} : 1.69 \pm 0.34$

** $\bar{X} : 1.53 \pm 0.09$

*** $\bar{X} : 0.36 \pm 0.06$

+muertos

0 número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

- no se identificó estadio larval.

Cuadro N° 3 (Cont.)
 en caracoles expuestos a 400 (1.50), 600 (1.91), 800 (2.44) y 12 horas. Laboratorio de San Juan de Dios, 1955

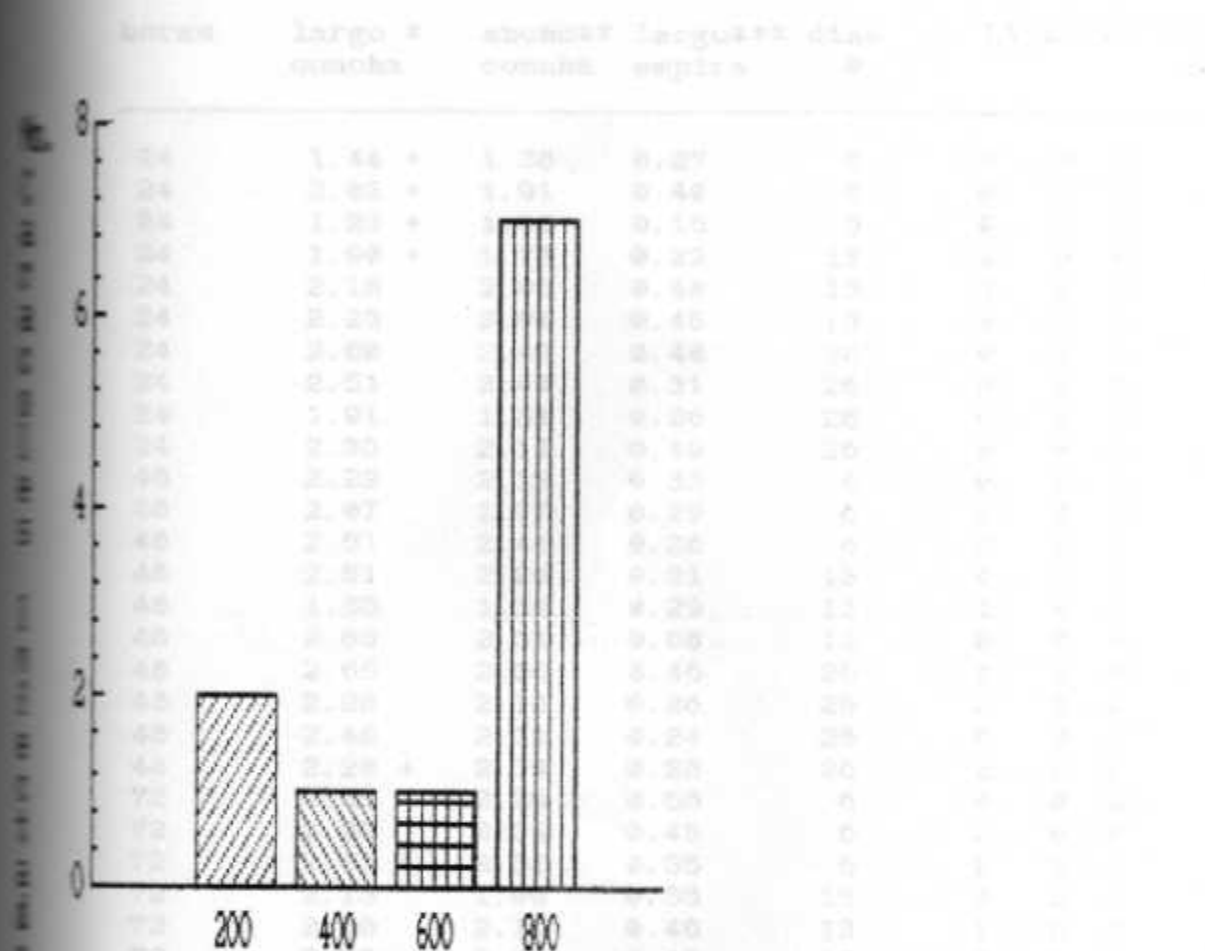


Fig. 2. Caracoles infectados con diferentes dosis de exposición de *L. de A. costaricensis*.

Total

$\bar{x} = 2.10 \pm 0.45$

$\bar{x} = 2.20 \pm 0.30$

$\bar{x} = 1.90 \pm 0.12$

Resumen

Se describen los datos transcritos entre la exposición y digestión.

Cuadro N4 :Tamaño (en cms), días de infección y larvas en caracoles expuestos a 400 L1/caracol durante 24, 48 y 72 horas. Laboratorio de Parasitología Hosp. San Juan de Dios. 1985.

horas	largo * concha	ancho** concha	largo*** espira	días @	L1	L2	L3	total de larvas
24	1.44 +	1.38	0.27	6	0	0	0	0
24	2.02 +	1.91	0.49	6	0	0	0	0
24	1.23 +	1.08	0.16	6	0	0	0	0
24	1.90 +	1.73	0.29	13	0	0	0	0
24	2.18	2.08	0.44	13	0	0	0	0
24	2.23	2.04	0.46	13	0	0	0	0
24	2.60	2.48	0.48	26	0	0	0	0
24	2.51	2.40	0.31	26	0	0	0	0
24	1.91	1.31	0.26	26	0	0	0	0
24	2.33	2.11	0.49	26	0	0	0	0
48	2.22	2.12	0.32	6	0	0	0	0
48	2.07	1.77	0.29	6	0	0	0	0
48	2.51	2.41	0.26	6	0	0	0	0
48	2.51	2.20	0.31	13	0	0	0	0
48	1.63	1.52	0.29	13	1	0	0	1
48	2.63	2.31	0.68	13	0	0	0	0
48	2.65	2.36	0.46	26	0	0	0	0
48	2.23	2.16	0.26	26	0	0	0	0
48	2.46	2.11	0.24	26	0	0	0	0
48	2.20 +	2.19	0.28	26	2	2	0	4
72	2.35	2.25	0.56	6	0	0	0	0
72	2.39	2.24	0.48	6	2	0	0	2
72	2.63 +	2.31	0.35	6	0	2	0	0
72	2.13	1.98	0.35	13	0	2	0	0
72	2.30	2.16	0.46	13	1	0	0	1
72	2.33	2.28	0.40	13	2	1	0	3
72	2.29	2.04	0.49	26	0	0	0	0
72	1.93	1.35	0.14	26	0	0	0	0
72	1.54	1.34	0.18	26	0	0	0	0
72	2.60	2.48	-	26	0	0	0	0
Total					8	7	0	11

* $\bar{X}$: 2.16 $\pm$ 0.45

** $\bar{X}$: 2.00 $\pm$ 0.39

*** $\bar{X}$: 0.36 $\pm$ 0.12

+muertos

@ número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

Cuadro N5 :Tamaños (en cm), días de infección y larvas en caracoles expuestos a 400 L1/caracol durante 24,48 y 72 horas. Laboratorio de Parasitología Hosp. San Juan de Dios. 1985.

horas	largo *	ancho**	largo***	días	L1	L2	L3	total de
	concha	concha	espira	@				larvas
24	2.31	2.23	0.29	6	0	0	0	0
24	1.63	1.49	0.21	6	0	0	0	0
24	1.84	1.73	0.20	6	0	0	0	0
24	2.62	2.37	0.99	13	0	0	0	0
24	1.89	1.57	0.34	13	0	0	0	0
24	1.40	1.32	0.16	13	1	0	0	1
24	1.69	1.53	0.24	26	-	-	-	1
24	1.52	1.34	0.19	26	0	0	0	0
24	1.94	1.89	0.16	26	2	0	0	2
24	1.69	1.42	0.16	26	0	0	0	0
48	2.47	2.36	0.44	6	2	0	0	2
48	1.46	1.33	0.23	6	0	0	0	0
48	1.52	1.44	0.16	6	0	0	0	0
48	2.31	2.25	0.32	13	1	0	0	1
48	2.00	1.98	0.49	13	0	1	0	1
48	1.50	1.42	0.19	13	0	0	0	0
48	2.14	1.35	0.24	26	0	0	2	2
48	1.99	1.73	0.19	26	0	0	0	0
48	1.89	1.79	0.16	26	0	0	0	0
48	1.67	1.50	0.16	26	0	0	0	0
72	1.56	1.48	0.26	6	2	0	0	2
72	2.48	2.35	0.39	6	1	0	0	1
72	2.48	2.41	0.69	6	0	0	0	0
72	2.41	2.29	0.38	13	0	0	0	0
72	1.85	1.71	0.27	13	0	0	0	0
72	1.41	1.29	0.15	13	1	1	0	2
72	2.57	2.30	0.18	26	0	0	5	5
72	2.10	1.80	0.17	26	0	0	0	0
72	1.94	1.76	0.27	26	0	0	0	0
72	1.96	1.79	0.25	26	0	0	0	0
Total					10	2	7	20

* $\bar{X}$: 1.93 $\pm$ 0.37

** $\bar{X}$: 1.77 $\pm$ 0.38

*** $\bar{X}$: 0.28 $\pm$ 0.17

^datos de la repetición

+muertos

@ número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

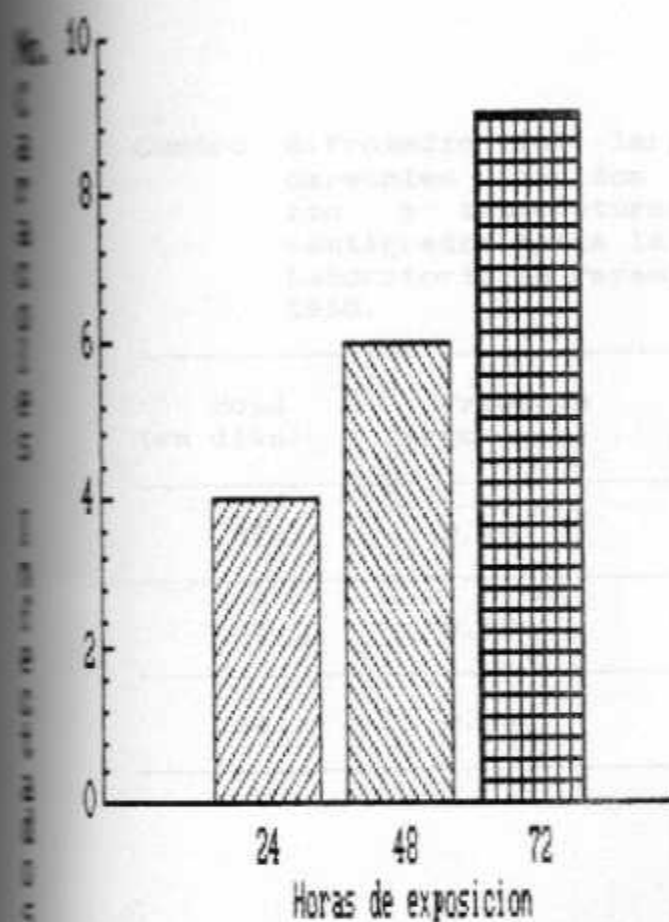


Fig. 3. No. de caracoles infectados segun horas de exposicion a L. de *A. costaricensis*.

Cuadro 6: Promedio del largo y ancho de la concha (en cm) de caracoles nacidos y mantenidos en el laboratorio a temperaturas entre los 25 y 28 grados centígrados hasta la edad de 37, 50 y 80 días. Laboratorio de Parasitología. Hosp. San Juan de Dios. 1985.

Edad (en días)	Promedio largo	Desv. stand	Promedio ancho	Desv. stand.
37	0.36	0.08	0.28	0.06
50	0.68	0.18	0.61	0.22
80	0.98	0.15	0.89	0.02

Cuadro N 7: Tamaño (en cm) días de infección y larvas en caracoles de 80 días expuestos a 400 L1/caracol por 72 horas. Laboratorio de Parasitología del Hosp. San Juan de Dios. 1986.

largo * concha	ancho ** concha	días @	L1	L2	L3	total de larvas
0.81	0.62	1	0	0	0	0
0.70	0.65	1	0	0	0	0
0.97	0.85	5	0	0	0	0
1.24 +	1.11	5	0	2	0	2
0.97 +	0.87	5	0	0	0	0
1.01 +	0.98	5	5	2	0	7
1.01	0.91	6	0	2	0	2
1.24 +	1.18	6	0	0	0	0
0.96	0.86	6	8	16	0	24
1.02	0.96	6	0	0	0	0
1.06	0.99	6	0	0	0	0
1.06	1.02	6	12	4	0	16
0.88	0.71	6	2	6	0	8
0.83	0.76	6	2	2	0	4
0.82	0.71	13	0	7	0	7
1.05	0.96	13	0	5	0	5
1.04	0.98	13	0	2	0	2
0.87	0.79	13	0	12	0	12
1.06	0.98	13	0	7	0	7
1.13	0.99	13	0	1	0	1
0.97 +	0.90	23	0	5	18	23
1.11	0.99	26	0	4	0	4
1.29	1.14	26	0	2	8	10
0.95	0.83	26	0	2	7	9
0.91	0.82	26	0	6	0	6
0.78	0.70	26	0	0	0	0
0.89	0.85	26	0	2	3	5
0.81	0.76	26	0	0	0	0
1.19	1.02	26	0	0	0	0
1.30	1.13	26	0	0	0	0
Total			21	89	33	154

* $\bar{X} : 0.98 \pm 0.02$

** $\bar{X} : 0.89 \pm 0.02$

+muertos

@ número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

Cuadro N° 8: Tamaño (en cm), días de infección y larvas en caracoles de más de 80 días expuestos a 400 L1/caracol por 72 horas. Laboratorio de Parasitología. Hosp. San Juan de Dios. 1986.

largo *	ancho **	espira***	días @	L1	L2	L3	total de larvas
2.62	2.28	0.39	6	0	0	0	0
2.26	1.96	0.49	6	0	0	0	0
3.47	3.31	0.83	6	4	0	0	4
2.85	2.78	0.57	6	5	0	0	5
2.95	2.84	0.66	6	0	0	0	0
4.00	3.87	1.05	6	0	0	0	0
2.46	2.39	0.37	6	0	0	0	0
3.26	2.85	0.46	6	0	0	0	0
3.07	2.93	0.55	6	0	4	0	4
2.76	2.66	0.31	13	0	0	0	0
2.66	2.61	0.30	13	0	0	0	0
2.29	2.24	0.35	13	0	0	0	0
2.77	2.63	0.41	13	0	0	0	0
3.46	3.20	0.36	13	0	0	0	0
3.27	2.94	0.36	13	0	0	0	0
2.75	2.50	0.51	13	0	0	0	0
3.36	3.18	0.63	13	0	0	0	0
2.91	2.73	0.59	13	0	0	2	2
2.47	2.46	0.39	26	-	-	-	3
2.84	2.73	0.51	26	-	-	-	7
3.29	3.04	0.41	26	0	0	4	4
2.55	2.28	0.36	26	0	0	0	0
2.91	2.85	0.46	26	0	0	0	0
3.09	2.48	0.39	26	0	0	0	0
3.51	3.17	0.31	26	0	0	2	2
2.33	2.66	0.55	26	0	0	0	0
3.35	3.04	0.63	26	0	0	0	0
3.52	2.95	0.47	26	0	2	2	4
2.82	2.68	0.61	26	0	2	2	4
2.81	2.76	0.49	26	0	0	0	0
Total				9	8	12	39

* $\bar{X}$: 2.95 $\pm$ 0.18

** $\bar{X}$: 2.76 $\pm$ 0.14

*** $\bar{X}$: 0.49 $\pm$ 0.20

+muertos

@ número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

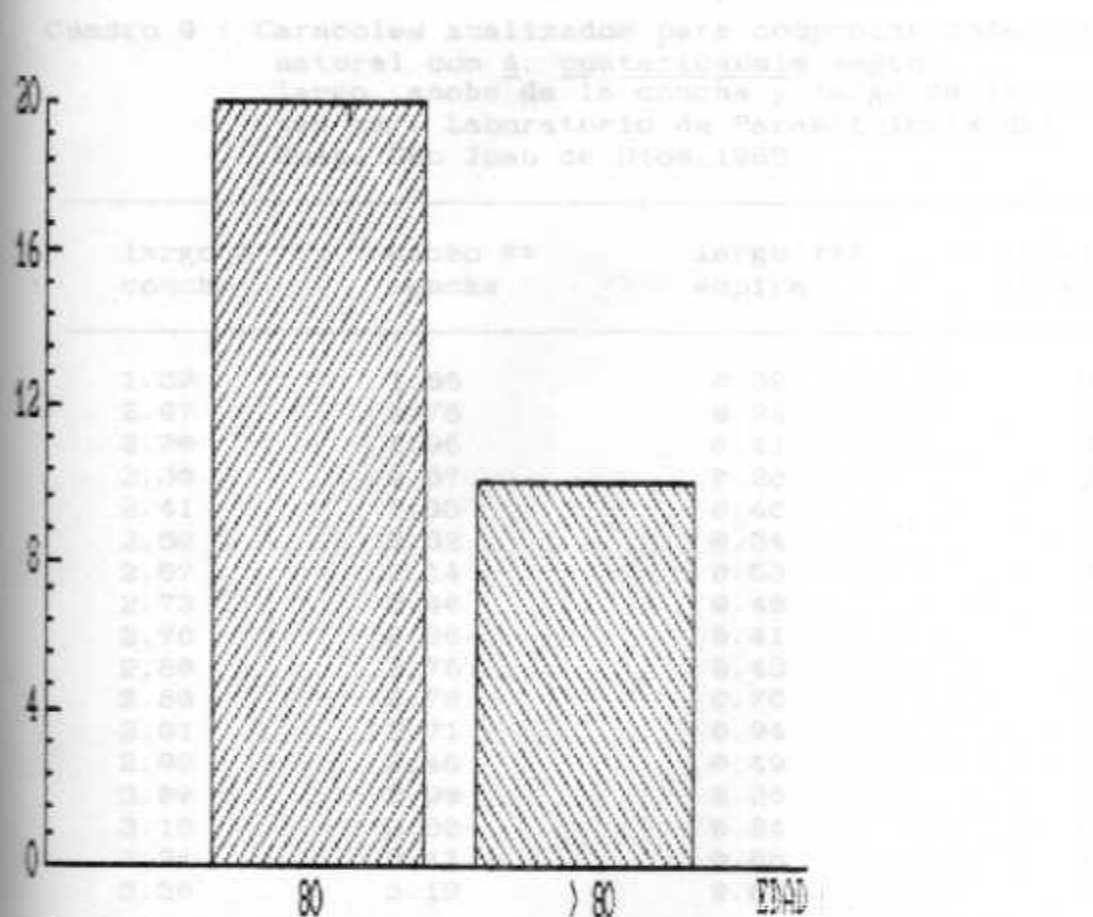


Fig. 4. Caracoles infectados con *L. de A. costaricensis* por rangos de edad.

Cuadro 9 : Caracoles analizados para comprobar infección natural con A. costaricensis según largo, ancho de la concha y largo de la espira (en cm). Laboratorio de Parasitología del Hosp. San Juan de Dios. 1985.

largo *	ancho **	largo ***	total de
concha	concha	espira	larvas
1.82	1.66	0.32	0
2.07	1.78	0.24	0
2.20	1.96	0.41	0
2.30	1.87	0.28	0
2.41	1.95	0.46	0
2.50	2.32	0.34	0
2.57	2.14	0.53	0
2.73	2.40	0.40	0
2.76	2.26	0.41	0
2.80	2.76	0.43	0
2.80	2.78	0.76	0
2.91	2.71	0.94	0
2.99	2.46	0.49	0
3.00	2.90	0.26	0
3.16	2.80	0.24	0
3.24	3.11	0.68	0
3.30	3.12	0.61	0
Total			0
* $\bar{X} : 2.62 \pm 0.49$			
** $\bar{X} : 2.37 \pm 0.51$			
*** $\bar{X} : 0.43 \pm 0.19$			

@ número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

Fig 5: Corte a través del pie de un caracol infectado. Cerca del epitelio de la superficie se observan dos cortes de una larva de tercer estadio rodeada por una delgada capa de amebocitos. Col.:hematoxilina-eosina.100X.

Fig 6: En el tejido fibromuscular del pie de un caracol infectado se observan dos cortes de larva de tercer estadio rodeados por una masa de amebocitos. En la larva inferior se observa que la cutícula está seriamente dañada. Col.:hematoxilina-eosina.250X.

DISCUSION

Hasta el momento se han infectado experimentalmente a *coarctatus* cuatro especies de caracoles palmípedos: *Helicoma trivolvis*, *Strophalaria striatata* (Coker) (1972), *S. alabrata* Kover, 1972 y *Strophalaria* sp. (Hernández, 1978). En el presente trabajo se ha demostrado que *Strophalaria* es el agente causante de la enfermedad experimental en *coarctatus* (Hernández, 1978). En la literatura se han reportado casos de *coarctatus* infectados experimentalmente con *S. alabrata* (Kover, 1972) y *S. striatata* (Coker, 1972). En la presente investigación se han observado cambios morfológicos en el paracitio de *coarctatus* infectado con *S. striatata* (Coker, 1972) en comparación con el no infectado (Hernández, 1978). En la presente investigación se han observado cambios morfológicos en el paracitio de *coarctatus* infectado con *S. striatata* (Coker, 1972) en comparación con el no infectado (Hernández, 1978).



o. Cerca
cortes de
elgada con

un caracol
de terru
En la larva
seriamente

En la presente investigación se han observado cambios morfológicos en el paracitio de *coarctatus* infectado con *S. striatata* (Coker, 1972) en comparación con el no infectado (Hernández, 1978). En la presente investigación se han observado cambios morfológicos en el paracitio de *coarctatus* infectado con *S. striatata* (Coker, 1972) en comparación con el no infectado (Hernández, 1978). En la presente investigación se han observado cambios morfológicos en el paracitio de *coarctatus* infectado con *S. striatata* (Coker, 1972) en comparación con el no infectado (Hernández, 1978). En la presente investigación se han observado cambios morfológicos en el paracitio de *coarctatus* infectado con *S. striatata* (Coker, 1972) en comparación con el no infectado (Hernández, 1978).



41a. 25 cuando aparecen y aparecen 10 madras y otros en. 400000.

DISCUSION

Hasta el momento se han infectado experimentalmente con A. costaricensis cuatro especies de caracoles pulmonados de agua dulce, Helisoma trivolvis, Biomphalaria straminea (Camacho, 1979) B. glabrata (Morera, 1986. com.pers) y Lymnaea sp (Hernandez, 1986 com.pers). Este trabajo añade un prosobranquio P. flabellata a la lista. Se han realizado trabajos de infección experimental en ampularidos como Pomacea paludosa (Wallace., Rosen, 1969a) y Pila ampullacea (Punyagupta, 1965) pero con A. cantonensis.

El promedio de larvas obtenidas en este trabajo de infección experimental de P. flagellata con 400 L1/caracol fue bajo ($\bar{X}$: 6.2) en comparación con el encontrado por Hernández (com.pers., 1986) en Lymnaea ($\bar{X}$: 38.36). Parece entonces que P. flagellata no es tan susceptible al parásito como Lymnaea sp, en este molusco el máximo de larvas encontradas en un solo caracol infectado con 400 L1/caracol fue de 110 (Hernandez, 1986 com.pers.) mientras que en el ampularido fue de 68 (cuadro 1). La observación del desarrollo larvario indica que los cambios de L1 a L2 y de L2 a L3 ocurre más lentamente en P. flagellata que en babosas de la familia Veronicelidae; en estas, las L3 maduras aparecen entre el décimo sexto y décimo noveno día (Morera, 1973), mientras que en Helisoma trivolvis (Camacho, 1979) y P. flagellata las L3 permanecen aún inmaduras y no es sino hasta el día 26 cuando empiezan a aparecer L3 maduras y activas, aunque

en poca cantidad (fig 1); esto parece indicar que las larvas posiblemente requieran de más tiempo de desarrollo en el caracol.

Cuando se inoculan ratas con 50 L3 de A. costaricensis desarrolladas en babosas (Veronicelidos) se obtienen un promedio de 27.6 adultos (Morera, 1986 com.pers.), de las desarrolladas en B. glabrata de 17 a 35 adultos (Morera et al, 1977), en Lymnae sp de 14 a 30 (Hernández, 1986 com. pers.)

inocularon 60 L3 inoculadas en una rata de milpa, lo que indica una mayor resistencia a la infección.

Los incrementos de 200 larvas no produjeron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el total de larvas por caracol, pero al comparar las dosis extremas de exposición (más baja con la más alta), en la que se da un incremento de 600 L1/caracol la diferencia entonces si es significativa ($P < 0.05$). Esto podría indicar que al existir más larvas en el medio (8,000 L1/bandeja) hay una mayor posibilidad de ingestión de estas por parte de los moluscos; esto se refleja en el promedio de larvas por caracol ($\bar{X} = 3.4$). Explicaría también por qué hay un mayor número de caracoles infectados con dosis de 800 L1/caracol (Fig. 2).

Al estar los caracoles expuestos a las larvas durante más tiempo existe mayor probabilidad de ingeran más larvas si se alimenta todos los días. En los cuadros 3 y 4 se observa que hay indican mayor número de larvas en aquellos

caracoles expuestos durante más tiempo (24 hs= $\bar{X}$:0.20 , 48 hs= $\bar{X}$:0.55 , 72hs = $\bar{X}$:0.8). También hay más caracoles infectados a 72 que a 48 horas y 24 horas, respectivamente (fig 3).

En el último ensayo se utilizaron caracoles de 80 días, nacidos en el laboratorio. El cuadro 7 indica el tamaño de los moluscos a diferentes edades. Estos tamaños se utilizaron como referencia para considerar los caracoles con medidas más largas como aquellos de más de 80 días. El hecho de que los caracoles de 80 días tengan más larvas ($\bar{X}$ =5.20) que los de más edad ($\bar{X}$ =1.30) (cuadros 8 y 9) y que además en estos últimos haya más caracoles infectados (fig 4), podría indicar que los caracoles más jóvenes son más susceptibles a la infección. Una correlación lineal simple muestra que existe una cierta relación entre el tamaño de la concha y el número de larvas por caracol; los caracoles pequeños contienen un mayor número de larvas ($r=-0.21$). Este hecho se puede explicar así: los caracoles de menor tamaño se alimentan más seguido que los más grandes, por lo que tienen la posibilidad de ingerir un mayor número de larvas. Los cortes histológicos demuestran la presencia de un mecanismo de defensa del huésped, el cual consiste en la proliferación de amebocitos alrededor de las larvas (Fig 5 y Fig 6). Además algunos parásitos muestran signos de degeneración, un fenómeno similar se había observado ya en Lymnae palustris (Rachford, 1976) infectadas con A. cantonensis . También la impregnación argéntica revela la formación de una fina capa de

fibras reticulares alrededor de las larvas. Este tipo de reacción celular en P. flagellata es muy parecida a la observada por Conejo (1985) en Veronicelidos. Además algunos parásitos muestran signos de degeneración, lo que podría explicar en parte los bajos índices de infección encontrados en este molusco.

Ya que P. flagellata es una especie que podría ser utilizada como alimento, es importante considerar su papel en la epidemiología de la angiostrongiliasis abdominal pues aunque parece ser una especie relativamente resistente, siempre se forman algunas larvas infectantes. Los estudios realizados hasta ahora demuestran una prevalencia de alrededor de 12 caso/100,000. hab. (Morera, 1985).

El estudio de caracoles no expuestos en el laboratorio (cuadros 2 y 9), no muestran la presencia del parásito adquirido naturalmente, sin embargo, esto no significa que no se produzca la infección natural.

Es evidente entonces que el caracol en estudio posee mecanismos de resistencia. Sin embargo sería importante tomar algunas precauciones para su consumo; hay que tener en cuenta que especies de Pila y Pomacea son huéspedes intermediarios de A. cantonensis un parásito del que se ha informado ya en América (Aguiar et al, 1981).

El consumo de caracoles, especialmente de Pila spp es muy común en muchas partes de Asia, como Tailandia (Alicata., Jindrak, 1970) y Malasia (Lim et al, 1978). Los diferentes grupos

etnicos consumen caracoles preparados en forma diversa, y de acuerdo a la época de producción. Así, a veces se come solo la porción muscular y se desecha la masa visceral donde se localizan helmintos como Fasciola y Echinostoma (Lim., et al, 1978).

Muchas veces la carne del caracol se sazona a veces se frie se hierven o se asa. Para prevenir la infección humana con A. cantonensis Alicata y Jindrak (1970) sugieren entre, otras cosas : a) evitar comer moluscos y crustáceos crudos y b) refrigerarlos y hervirlos no menos de 2 minutos. Muchos de los casos de angiostrongilosis en la región del Pacífico y en los países del Sureste Asiático se han debido al consumo de caracoles de agua dulce, crustáceos y caracoles terrestres en estado crudo o parcialmente cocinados (Jindrak., Alicata, 1965., Punyagupta, 1965.,). En cuanto a A. costaricensis si bien hasta el momento no se han realizado estudios sobre si el calor disminuye la capacidad de las larvas de infectar al mamífero es muy probable que el evitar comer los caracoles crudos y hervirlos llegue a ocasionar daños al parásito, de modo que afecte su capacidad de infección tal como sucede en A. cantonensis (vease Alicata, 1967).

Morera (1986, com.pers.) ha observado que la refrigeración de la L3 a 4-6 grados centígrados durante 72 horas disminuye su capacidad de infección. Por otro lado, si las larvas se dejan en

ácido acético 0.1 % durante 72 horas, el porcentaje de infección baja a un 19.3 %.

Por lo tanto, las recomendaciones preliminares que proponíamos para prevenir la angiostrongiliasis abdominal por el consumo de caracoles serían:

a) evitar comer los caracoles crudos
b) refrigerarlos a 4-6 grados centígrados por o durante no menos de 72 horas.

c) agregar ácido acético a concentraciones no menores de 0.1 % durante 72 horas.

Se concluye que:

1- Los caracoles de menor tamaño contienen menor número de larvas.

2- Hay una reacción celular del caracol contra las larvas del parásito que se caracteriza por la proliferación de células y la formación de una delgada capa de fibras que rodea a las larvas.

3- Se encontró infección natural.

4- Se sugiere como recomendaciones para evitar la angiostrongiliasis abdominal por ingestión de caracoles: evitar comer caracoles crudos, refrigerarlos por no menos de 72 horas a 4-6 grados centígrados o utilizar concentraciones de ácido acético de 0.1 % durante 72 horas.

CONCLUSIONES

- 1- Pomacea flagellata es poco susceptible a la infección experimental con A. costaricensis.
- 2 - Las larvas de A. costaricensis se ubican tanto en la porción muscular como en las vísceras en P. flagellata.
- 3 - La mayoría de las larvas L3 al día 26 post-infección permanecen inactivas.
- 4- Un mayor número de larvas en el medio y durante varios días produce en los caracoles un mayor número de larvas por caracol y un mayor número de caracoles infectados.
- 5- Los caracoles de menor tamaño, tienden a tener mayor número de larvas.
- 6- Hay una reacción celular del caracol contra las larvas del parásito que se caracteriza por la proliferación de amebocitos y la formación de una delgada cápsula de fibras reticulares.
- 7 - No se encontró infección natural.
- 8 - Se sugiere como recomendaciones para evitar casos humanos de angiostrongylosis abdominal por ingestión de estos caracoles: evitar comer caracoles crudos; cocinarlos, refrigerarlos por no menos de 72 horas a no más de 4-6 grados centígrados o utilizar concentraciones de ácido acético al 0.1 % durante no menos de 72 horas.

RESUMEN

El trabajo se efectuó en el Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

En la primera parte del trabajo, se procedió a la infección de ejemplares de Pomacea flagellata (Gastropoda: Ampullariidae) con Angiostrongylus costaricensi (Nematoda: Metastrongyliidae). Tres grupos de 10 caracoles se colocaron en sendas bandejas plásticas expuestas a 400 L1/caracol durante 72 horas. Para observar el desarrollo larvario se utilizó el método de Wallace y Rosen (1969) y Baermann (1917); se digirieron caracoles al sexto, décimotercero y vigésimo sexto día posterior al último día de infección. En esta última fecha se empezaron a encontrar L3 maduras y móviles. El máximo de larvas encontradas en un solo caracol fue de 68. Sesenta de estas se inocularon en Sigmodon hispidus. Se recuperaron 3 adultos en las arterias mesentericas de la región ileocecal.

En la segunda parte 40 caracoles se expusieron a 200L1/caracol, 400L1/caracol, 600L1/caracol y 800L1/caracol por 72 horas. En la tercera parte se expusieron 30 caracoles a durante 24, 48 y 72 horas con 400L1/caracol. En la cuarta parte se expusieron 30 individuos de 80 días de edad y 30 de más de 80 días a 400 L1/caracol.

Se encontró mayor número de larvas por caracol y más caracoles infectados a una exposición de 800 L1/caracol, así como a

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, H., J. Gispert., ., B.Dumenigo, ., Gloria .Perera., M. Galvez. 1981. Angiostrongylus cantonensis. Hospederos intermediarios en dos provincias habaneras. Rev.Cub.Med.Trop., 33 : 173-177.
- Ash, L. R. 1967. Angiostrongylus michiganensis (Nematoda, Metastrongyloidea) lungworm occurring in the shrew, Sorex cinereus cinereus in Michigan. J. Parasit., 53:625-629.
- Alicata, J.E. 1967. Effect of freezing and boiling on the infectivity of third-stage larvae of Angiostrongylus cantonensis present in land snails and freshwater prawns. J. Parasitol., 53(5): 1064-1066.
- Alicata, J.E. 1968. Angiostrongylus sandarsae sp.n. (Nematoda :Metastrongyloidea), a lungworm of rodents in Mozambique, East Africa. J. Parasit., 54: 896-899.
- Alicata, J.E., & K.Jindrak .1970. Angiostrongylosis in the Pacific and Southeast Asia. Charles C. Thomas Publisher. Ed. Hamilton H. Anderson. 105p.
- Baermann, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematodem) larven in Erdproben Medel. Geneesk. Lab. Walteureden, Feetbundd, Bataria pp:41-47.
- Baillet, C.C. 1866. Helminthes. N. Dict. Prat. Med.Vet., 8:519-687.
- Bartlet, Karen., T.J Trust., .1976. Isolation of Salmonellae and other Potential Pathogens from the freshwater Aquarium snail Ampullaria. Appl. Env. Microb., 31:635-639.
- Baylis, H. A. 1928. On the collection of nematodes from Nigerian mammals (chiefly rodents). Parasitology, 20:280-304.
- Bhaibulaya, M. 1968. A new species of Angiostrongylus in an Australian rat, Rattus fuscipes. Parasitology, 58: 789-792.
- talpoides Temmicks. Jap. J. Parasit. 21:15-22.

- Bhaibulaya, M & J.H Cross. 1971. Angiostrongylus malaysiensis (Nematoda: Metastrongylidae), a new species of rat lungworm from Malaysia Southeast Asian J. Trop. Med.Hlth. 2:527-533.
- Biocca, E. 1957. Angiostrongylus chabaudi n.sp. parasita del cuore e dei vasi pulmonari del gatto selvatico (Felis silvestris). Att. Accad. naz. Lincei. R.C., 22: 526-532.
- Bonne, C., Bras, G y Lie, K.J. 1953. Five echinostomes in the Malayan Archipelago. Am. J. Digest. Dis. 20:12-16.
- Camacho, H. 1979. Ecología y suceptibilidad de Helisoma trivolvis a la Angiostrongylus costaricensis. Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. 75p.
- Collet, S.F. 1975. Sizes of snail kites and limpkins in a Costa Rican marsh. The Veliger. 24(4):365-370.
- Conejo, Marta. E. 1985. Influencia de la edad de Vaginilus plebeius en la infección natural con Angiostrongylus costaricensis. Memoria de Práctica Dirigida para optar por el grado de Licenciada en Biología. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. 41p.
- Cheng, H.T. 1935. Un nouveau nematode pulmonaire, Pulmonema cantonensis n.g., n.sp. des rats de Canton. Annls.Parasit. hum .Comp., 13:312-317.
- Dougherty, E.G. 1946. The genus Aleurostrongylus Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongylidae) and its relatives, with the description of Parafilaroides, gen. nov. and Angiostrongylus gubernaculatus. sp. nov. Proc.Helminth.Soc. Wash., 13:16-25.
- Drodzda, J & J.M Doby, 1970. Angiostrongylus dujardini sp.n. (Nematoda: Metastrongyloidea), parasite de rongeurs (Apodemus sylvaticus et Clethrionomys glareolus). Bull. Soc. Zool. France, 95:659-668.
799.
- Hanning, G.W. & W.S., Leedmon,. 1978. Schistosome dermatitis from Pomacea paludosa (Say) (Prosobranchia :Pilidae). Nautilis., 92(3):105-106.

- Harinasuta, C. P., P. Setasubun y P. Radomyca. 1965. Observations on Angiostrongylus cantonensis in rats and mollusks in Thailand. J. Med. Assoc. Thailand., 48:158-172.
- Hoffler, D. F. 1974. Cercarial dermatitis, etiology, epidemiology, and clinical aspects. Arch. Env. Health. 225-229.
- Kinsella, J. M. 1971. Angiostrongylus schmidtii sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea) from the rice rat, Oryzomys palustris in Florida, with a key to the species of Angiostrongylus Kamensky, 1905. J. Parasit. 57:494-497.
- Kushland, J. 1978. Predation on apple snail eggs (Pomacea). Nautilus 92(1):57-58.
- Lim, B. L., C. P. Ramachandran, C. P. 1979. Ecological studies on Angiostrongylus malaysiensis (Nematoda: Metastrongylidae) in Malaysia. IN: Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia. Ed. Cross, J. pp 26-48.
- Lim, B. L., C. K. Ow-Yang y K. J. Lie. 1965. Natural infection of A. cantonensis in Malaysian rodents and intermediate hosts and preliminary observations on acquired resistance. Am. J. Trop. Med., 14:610-617.
- Lim, B. L., Yap, L. F., Krishnansamy, M., Ramachandran, D. y Sharif, M. 1978. Freshwater snail consumption and Angiostrongyliasis in Malaya. Trop. Geog. Med., 30:241-246.
- Loria-Cortés, R y L. F. Lobo-Sanahuja, . 1980. Clinical abdominal A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by Angiostrongylus costaricensis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:538-544.
- Maleck, E. 1980. Snail-transmitted parasitic diseases. Vol 1. CRC Press, Inc. Florida. USA. 334p.
- Maleck, E., Cheng, T. 1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press. New York. 398p.
- Mayta, R. 1978. Estudio sobre biología del "churo" (Pomacea maculata) Perry, Gastropoda : Ampullariidae) en el laboratorio. Anal. Cient. UNA XVI (1-4):11-14.

- Martens E. Von. 1901. Land and freshwater. Mollusca IN: Biologia Centrali-Americana. Zoologia 9:1-706.
- Merdivenci, A. 1964. A new lungworm Angiostrongylus sciuri, n.sp. parasiting the venae pulmonales of the squirrel, Sciuri vulgaris, Istanbul, Univ. Fen. Fak. Mecm., 29:155-158.
- Monge, E., R. Arroyo y E. Solano. 1978. A new definitive natural hosts of Angiostrongylus costaricensis in marmosets (Saguinus mystax). Lab. Anim. Sci. 32:286-288.
- Morera, P. 1973. Life History and redescription of Angiostrongylus costaricensis. Morera and Cespedes, 1971., Am. J. Trop. Med. Hyg. 22 (5):613-621.
- Morera, P. 1984. Abdominal angiostrongyliasis. A Problem of Public Health. Monografia mimeografiada. Universidad de Costa Rica.
- Morera, P. 1985. Abdominal Angiostrongyliasis: A Problem of Public Health. Parasit. Today., 1(6):173-175.
- Morera, P., & R. Cespedes. 1971a. Angiostrongilosis abdominal. Acta Med. Cost. 11(3):159-173.
- Morera, P. & R. Cespedes. 1971b. Angiostrongylus costaricensis n.sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) a new lungworm occurring in man in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 18:173-185.
- Morera, P., R. Arroyo, y E. Solano. 1977. Infección de ratas salvajes con Angiostrongylus costaricensis por vía subcutánea e intraperitoneal. Rev. Biol. Trop. 25(2):257-261.
- Morera, P., J. Perez., F. Mora. y L. Castro. 1982. Visceral larva migrans-like syndrome caused by Angiostrongylus costaricensis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31(1):67-70.
- Morrison, J. P. E. 1946. The nonmarine mollusks of San Jose Islands with notes of those of Pedro Gonzales Islands., Pearl Islands. Panama Smith. Mis. Col. 106 (6):1-49.

- Nasir, P., & M. Diaz. 1967. Studies of freshwater larval trematodes. XV. An unusual Xiphidiocercaria, Cercaria pifanoi from Venezuela. Proc. Helm. Soc. Wash. 34(2): 135-137.
- Nasir, P., & M. Diaz. 1968. Studies of freshwater larval trematodes. Part XVI. Five new species of cercariae from Venezuela. Proc. Helminth. Soc. Wash. 35(1):66-73.
- Nasir, P., Josefina, Silva. 1972. Freshwater larval trematodes XXIX. Life cycle of paraseudoconcilia sp. n. Proc. Helminth. Soc. Wash. 39(1):142-147.
- Nasir, P., & M. Diaz. 1973. Freshwater larval trematodes XXXI. Two new species of cercariae. Proc. Helminth. Soc. Wash. 40(1):69-73.
- Nasir, P., M. Diaz, L. Hamana., y S. Guevara. 1969. Studies on freshwater larval trematodes. XXI. Two new species of Macrocerus cercariae. Proc. Helminth. Soc. 36(1):102-106.
- Nasir, P. 1971. Freshwater larval trematodes XXVIII. Three new species of cercariae. Proc. Helminth. Soc. 33(2):206-210.
- Nasir, P., & A. Cedeño. 1966. Studies on freshwater larval trematodes. Part XIII. Some new species of cercariae from Venezuela. Proc. Helminth. Soc. Wash. 33(1): 96-100.
- Nasir, P. 1964. Studies on freshwater larval trematodes. Part V. A new polyadenous xiphidiocercaria, C. baldai from Venezuela. Proc. Helminth. Soc. Wash. 31:28-30.
- Nasir, P., y C. A. Acuña. 1966. Studies on freshwater larval trematodes. Part VIII. The new species of non-virgulate xiphidiocercariae from Venezuela. Zool. Anz. 176:291-296.
- Ogren, R. B. 1954. A lungworm, Angiostrongylus blarini n. sp. from the short-tailed shrew, with observations on the histopathology and life cycle. J. Parasit. 40:681-685.
- Ohbayashi, M., T. Masegi y K. Kubota. 1973. Further observations on parasites of the Japanese shrew male, Utotrichus

- Pennak, R. 1953. Freshwater invertebrates of the United States. The Ronald Press Company. New York. 769p.
- Panyagupta, S. 1965. Eosinophilic meningoencephalitis in Thailand : Summary of 9 cases and observations on Angiostrongylus cantonensis as a causative agent and Pila ampullacea as a new intermediate hosts. Am. J. Trop. Med. 14:370-374.
- Rachford, F. 1976. Host Relationship of Angiostrongylus cantonensis in Lymnaea palustris. II Histopathology. Exp. Parasit. 39:382-392.
- Robles, G., R. Loria., A. Robles., S. Valle., y C. Cordero. 1968. Granuloma eosinofílico parasitario intestinal. Rev.
- Ruiz, P., Morera, P. 1983. Spermatoc artery obstructions caused by Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 32(6):1458-1459.
- Schulz, R. S., I. W. Orlov, y A. I. Kutass., 1933. Zur Systematik der Subfamilie Syntheloa caulinae Skrj., 1932 nebst Beschreibung einiger neuer Gattungen und Arten). Zool. Anz. 102:303-310.
- Sly, D. C., J. D. Toft., G. H. Gardiner y W. T. London. 1982. Spontaneous occurrence of Angiostrongylus costaricensis in marmosets (Saguinus mystax). Lab. Anim. Sci. 32: 286-299.
- Snyder, N. F. R. y Snyder, 1969. A comparative study of molluscs by Limpkins, Everglade kites, and Boat-tailed grackles. The Living Bird.
- Soltys, A. 1953. Helminthofauna ryjowko-watych (Soricidae) Bailowieskiego Parko Narodowego. Acta Parasit. pop., 1:353-402.
- Tesh, R., L. Ackerman., W. Dietz y J. Williams. 1973. Angiostrongylus costaricensis in Panama. Prevalence and Pathological changes in wild rodents infected with parasite. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22:348-356.
- Travassos, L. 1927. Nematodes novos, Bolm. Biol. Lab. Parasit. Fac. Med. S. Paolo., 6:52-61.

- Wallace, G., L. Rosen. 1969a. Experimental infection of Pacific Island Mollusks with Angiostrongylus cantonensis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18(1):13-19.
- Wallace, G. & L. Rosen. 1969b. Studies on eosinophilic meningitis V. Molluscan hosts on Pacific Islands., Am. J. Trop. Med. Hyg. 18(1):13-19
- Wallace, G. D. y L. Rosen, .1969c. Techniques for recovering and indentifying larvae of Angiostrongylus cantonesis from Mollusca. Malacologia 7:427-438.
- Yamuti, S. 1941. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 35. Mammalian nematodes, II. Jap. J. Zool., 9:409-439.