

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

INFECCION EXPERIMENTAL DE Lymnaea sp (GASTROPODA: LYMNAEIDAE)

CON Angiostrongylus costaricensis MORERA Y CESPEDES 1971

(NEMATODA: ANGIOSTRONGYLIDAE)

LIDIA MAYELA HERNANDEZ ROJAS

MEMORIA DE LA PRACTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGIA CON ENFASIS EN ZOOLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA "RODRIGO FACIO"

1986

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

INFECCION EXPERIMENTAL DE Lymnaea sp (GASTROPODA: LYMNAEIDAE)

CON Angiostrongylus costaricensis MORERA Y CESPEDES 1971

(NEMATODA: ANGIOSTRONGYLIDAE)

LIDIA MAYELA HERNANDEZ ROJAS

MEMORIA DE LA PRACTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN BIOLOGIA CON ENFASIS EN ZOOLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA "RODRIGO FACIO"

1986

INFECCION EXPERIMENTAL DE Lymnaea sp (GASTROPODA: LYMNAEIDAE)

CON Angiostrongylus costaricensis MORERA Y CESPEDES 1971

(NEMATODA: ANGIOSTRONGYLIDAE)

Memoria de la práctica dirigida presentada a la Escuela de Biología

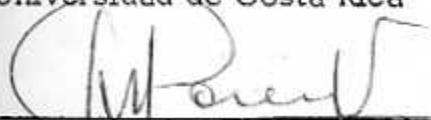
como requisito para optar al grado de

Licenciada en Biología con énfasis en Zoología



Lic. Hernán Camacho V.
Universidad de Costa Rica

Director de Práctica



Dr. Pedro Morera V.
Universidad de Costa Rica

Co-Director de Práctica



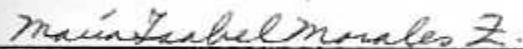
Dr. Carlos Valerio R.
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal



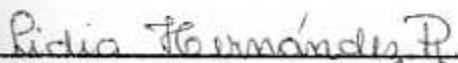
M. Sc. Carlos Villalobos S.
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal



M. Sc. María Isabel Morales Z.
Universidad de Costa Rica

Subdirectora de la Escuela



Lidia Mayela Hernández Rojas

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Alberto López por su orientación, por la orientación que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo, por sus sugerencias y comentarios que me permitieron avanzar con la mayor claridad.

Al Dr. Carlos Valente, quien me hizo posible y me brindó el apoyo y por su apoyo en la realización del trabajo.

Al M. Sc. Carlos Villalobos y a la M. Sc. María Luján por su revisión del manuscrito.

DEDICATORIA

Mi especial agradecimiento a la Lic. María Luján por sus valiosas observaciones durante el desarrollo del trabajo y por su desinteresada colaboración. **A mis padres y hermanos quienes siempre me han brindado apoyo, estímulo y comprensión.**

A Ana Cristina Riquelme por sus comentarios y la estadística. A Marcelo Scola quien me ayudó en la recolección de los caricotas. A Nelly Vázquez por el material gráfico.

A mis compañeros y amigos que en distintos momentos me brindaron apoyo en los momentos que más lo necesité.

AGRADECIMIENTO

CONTENIDO

Quiero expresar mi gratitud al Lic. Hernán Camacho y al Dr. Pedro Morrera, por la orientación que me brindaron durante el desarrollo de este estudio, por sus sugerencias y correcciones para que el manuscrito fuera expresado con la mayor claridad.

Al Dr. Carlos Valerio, quien me ha guiado y aconsejado por varios años y por su apoyo en la realización del trabajo.

Introducción

Al M. Sc. Carlos Villalobos y a la M. Sc. María Isabel Morales por la revisión del manuscrito.

Resultados

Mi especial agradecimiento a la Lic. Marta Conejo por la gran ayuda y valiosas observaciones durante el desarrollo del estudio. A Arnoldo Castro por su desinteresada colaboración.

Conclusiones

A Ana Cristina Briceño por sus comentarios y la ayuda en el análisis estadístico. A Mauricio García quien en varias ocasiones colaboró en la colecta de los caracoles. A Nelly Vásquez por el positivado de las fotografías.

A mis compañeros y amigos que en distintas formas me alentaron en los momentos que más lo necesité.

LISTA DE CUADROS

CONTENIDO

	<u>Página</u>
<p>Cuadro 1: Número de larvas de <i>A. costaricensis</i> en los cuerpos de adultos infectados en el cuerpo y en el intestino delgado durante tres días en las dosis de 100, 400, 600 y 800 L₁/caracol.</p> <p>Lista de cuadros</p>	1
<p>Lista de figuras</p>	iii
<p>Cuadro 2: Número de larvas de <i>A. costaricensis</i> en los cuerpos de adultos infectados en el cuerpo y en el intestino delgado durante tres días en las dosis de 100, 400, 600 y 800 L₁/caracol.</p> <p>Introducción</p>	1
<p>Materiales y métodos</p>	14
<p>Resultados</p>	21
<p>Discusión</p>	25
<p>Cuadro 3: Número de larvas de <i>A. costaricensis</i> en los cuerpos de adultos infectados en el cuerpo y en el intestino delgado durante tres días en las dosis de 100, 400, 600 y 800 L₁/caracol.</p> <p>Conclusiones</p>	33
<p>Resumen</p>	34
<p>Bibliografía</p>	43

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1: Número de larvas de A. costarricensis en Lymnaea sp adultos colectados en el campo y expuestos a 400 L₁/caracol durante tres días en el Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

35

Cuadro 2: Número de larvas de A. costarricensis en Lymnaea sp adultos colectados en el campo y expuestos a 200, 400, 600 y 800 L₁/caracol durante tres días en el Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

36

Cuadro 3: Número de larvas de A. costarricensis en Lymnaea sp adultos nacidos en el laboratorio y expuestos a 400 L₁/caracol durante 24, 48 y 72 horas, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

37

Cuadro 4: Larvas de A. costarricensis y número de caracoles adultos infectados colectados en el campo, expuestos a 200, 400, 600 y 800 L₁/caracol durante tres días, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

38

- Cuadro 5: Larvas de A. costaricensis y número de caracoles adultos infectados nacidos en el laboratorio, expuestos a 400 L₁/caracol durante 24, 48 y 72 horas, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios. 38
- Cuadro 6: Número de larvas de A. costaricensis en Lymnaea sp juveniles nacidos en el laboratorio, expuestos a 400 L₁/caracol durante tres días, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios. 39
- Cuadro 7: Número y porcentaje de L₃ activas e inactivas y de Lymnaea sp adultos colectados en el campo y de juveniles nacidos en el laboratorio, expuestos a 400 L₁/caracol durante tres días, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios. 40
- Cuadro 8: Número de adultos de A. costaricensis recuperados en ratas (Sigmodon hispidus) inoculadas con L₃ obtenidas de caracoles infectados experimentalmente. 41

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página</u>
<p>Fig. 1 Corte de un caracol infectado. En los cortes transversales de la larva de tercer estadio se puede observar la integridad de la cutícula; en algunas de las larvas se pueden observar dos pequeñas estructuras en forma de diminutas espinas que corresponden a las alas laterales de las larvas. Col. hematoxilina-eosina. 250 X</p>	42
<p>Fig. 2 Corte longitudinal de una larva de tercer estadio en los tejidos del caracol. Obsérvese la integridad de la cutícula y la ausencia de reacción celular alrededor de la larva. Col. hematoxilina-eosina. 250 X</p>	42

INTRODUCCION

Los caracoles de la familia Lymnaeidae son moluscos de la clase Gastropoda, orden Pulmonata y del suborden Basomatophora, el cual comprende además las familias: Planorbidae, Physidae y Ancyliidae (Malek, 1962).

Los gastrópodos pulmonados habitan principalmente en agua dulce, unos pocos son marinos, terrestres o de agua salobre. No poseen branquias, ya que una parte de la cavidad del manto sirve como pulmón; algunos poseen una pseudobranquia para su intercambio gaseoso. Cuando tienen concha, es usualmente simple, de espiras regulares y algunas veces rudimentarias. Son organismos hermafroditas, en su mayoría ovíparos, pero algunas veces son ovovivíparos. No presentan opérculo, excepto los del género marino Amphibola (Malek, 1962; Malek y Cheng, 1974).

El suborden Basomatophora se caracteriza por poseer un par de tentáculos contráctiles con ojos en su base. La concha es cónica, discoidal o pateliforme. El tracto genital del macho y de la hembra se abren separadamente, muy cerca uno del otro. En su mayoría son caracoles de agua dulce.

En los miembros de la familia Lymnaeidae, la concha es dextrógira

y ovaladamente oblonga. La espira es más o menos atenuada y varía considerablemente en longitud. El eje columelar es típicamente espiralado o arrollado. En la espira, la concha varía en grosor y tamaño.

El animal también es dextrógiro, con tentáculos aplastados y en corte transversal, triangulares (no filiformes). El diente central de la rádula es unicúspide, mientras que los laterales son bi o tricúspides. Los marginales son multicúspides o dentellados. El riñon es alargado, ancho y piriforme. La abertura genital y el ano están al lado derecho.

Existen desacuerdos entre los malacólogos en cuanto al número de géneros de la familia. Algunos consideran que todas las especies pertenecen a un solo género, Lymnaea. Otros elevan a nivel genérico los subgéneros: Pseudosuccinea, Bulimnea, Acella, Fossaria y Stagnicola (Malek, 1962). Sin embargo, al margen de esta discordancia de opiniones, no hay que perder de vista su importancia médica y veterinaria, ya que son huéspedes intermediarios naturales de tremátodos que parasitan humanos y otros animales (Olsen, 1973).

La primera descripción de la relación entre un tremátodo digenético y un caracol huésped, resultó de las investigaciones del ciclo de vida de Fasciola hepatica L., y su desarrollo en Lymnaea trunculata Müll por A. P. Thomas en 1883 (Brown, 1978).

Malek y Cheng (1974), presentan una lista de algunas de las especies de tremátodos más importantes, en los cuales participan caracoles de la familia Lymnaeidae, como huéspedes intermediarios en su ciclo de vida. Entre ellos están:

-Lymnaea natalensis (Krauss) huésped intermediario de Fasciola gigantica, en Africa.

-L. swinboei (Adams) huésped intermediario primario y algunas veces secundario de Echinostoma revolutum, en Formosa.

-Fossaria trunculata huésped intermediario de F. hepatica en Europa y Norte de Africa.

-Pseudosuccinea columella (Say) y Fossaria cubensis (Pfeiffer), son huéspedes intermediarios de Heterobilharzia americana (parásito de coatí, perro, nutria, conejos), en Lousiana. F. cubensis es también huésped intermediario de Paramphistomun microbothrioides (parásito de ganado, ovejas) y de F. hepatica, en Lousiana.

-Stagnicola palustris (Müller) huésped intermediario de Schistosomium douthitti (parásito de roedores) y Trichobilharzia ocellata (parásito de patos, cercetas); también es huésped intermediario primario de Echinoparyphium flexum (parásito de patos) y de Protechinostoma

mucronisertulatum (parásito de ave zancuda), en Michigan.

-Stagnicola emarginata angulata huésped intermediario de Trichobilharzia stagnicolae, Diplostomun flexicaudum (parásito de gaviotas), Cotylurus communis (parásitos de gaviotas), Notocotylus urbanensis (parásitos de aves), Euparyphium beaveri (parásito de visón, nutria), Plagiorchis micracanthus (parásito de murciélagos, ratones) y Eustomos chelydrae (parásito de tortugas). S. emarginata angulata es también huésped primario y secundario de Plagiorchis muris (parásito de ratas, palomas, hombre) y P. proximus (parásito de rata almizclera, ratones) y Cotylurus flabelliformis (parásito de patos), en Michigan.

-Stagnicola bulimoides huésped intermediario primario y secundario de Opisthiolepis locellus (parásito de ranas, sapos).

-Stagnicola reflexa huésped intermediario secundario de Cotylurus flabelliformis y Fascioloides magna (parásito de venado).

-Stagnicola caperata huésped de F. magna.

-Lymnaea stagnalis appressa huésped de Opisthiolepis ranae, O. rastellus, Eustomos chelydrae, Diplostomun spatheceum, D. flexicaudum. Además, es huésped intermediario primario y secundario de Cotylurus flabelliformis; huésped intermediario en aves de Trichobilharzia

ocellata y en mamíferos de Schistosomatium douthitti. S. douthitti y Cercaria elvae causan dermatitis cercarial en el hombre.

En Costa Rica, Brenes y Soto (1968), colectaron moluscos en el Caserío La Peña, Laguna de Alfaro Ruiz, Turrialba, Tilarán, San Miguel de Desamparados, Curridabat, Carrillos y Agua Caliente de Cartago, e informaron de la presencia de Physa heterostropha (Gastropoda: Physidae), Succinea concordalis (Gastropoda: Lymnaeidae) y Helisoma tenuis Philippi (Gastropoda: Planorbidae), pero ninguno con cercarias semejantes a las del grupo gimnocéfalo (Fasciolidae).

Tonn et al. (1964), encontraron en Coris de Cartago xifidiocercarias, estrigeideocercarias y una cercaria gimnocéfala correspondiente a Fasciolidae, en Helisoma caribaeum guatemalensis (Gastropoda: Planorbidae) y Stenophysa pliculosa Classin (Gastropoda: Physidae).

Numerosos estudios experimentales se realizan con miembros de la familia Lymnaeidae por su importancia en salud pública. Se han reportado infecciones experimentales de Lymnaea catasopium con Schistosomatium douthitti (Loker, 1979); L. tomentosa con Fasciola hepatica (Stpicznaska, 1979); L. natalensis con F. gigantica (Ogamba y Goodman, 1976), entre otros.

Los limneidos también son huéspedes intermediarios de nemátodos. Lymnaea palustris se ha infectado experimentalmente con Angiostrongylus cantonensis (Kocan, 1972; Rachford, 1976 a), al igual que Lymnaea tomentosa (Eckert y Lämmler, 1972). Richards y Merrit (1967), estudiaron la susceptibilidad de varios caracoles de agua dulce, entre ellos una especie de Lymnaea, a larvas de A. cantonensis. Kralka y Samuel (1984), informaron sobre la emergencia de larvas de tercer estadio de nemátodos parásitos de la superfamilia Metastrongiloidea, específicamente de las familias Angiostrongylidae y Protostrongylidae. Como se puede apreciar, no existe ningún informe de Lymnaeidos que participen en el ciclo de vida de A. costaricensis.

La superfamilia Metastrongiloidea se ubica en el phylum Nematoda, clase Aphasmeida, orden Strongylata, que comprende las siguientes familias: Angiostrongylidae, Protostrongylidae, Cresomatidae, Filaroididae, Skryabingylidae, Pseudaliidae y Metastrongylidae.

La familia Angiostrongylidae está integrada por gusanos filiformes que parasitan ductos del sistema respiratorio, circulatorio o vasos sanguíneos de algunos tejidos especializados (pulmón y cerebro). El género Angiostrongylus fue establecido para Strongylus vasorum Baillet (1866), por Kamenskii. Hasta el momento, un total de 18 especies han sido incluidas en el género Angiostrongylus (Ash, 1967; Morera y Céspedes,

1971 a; Bhaibulaya, 1979), a saber: A. vasorum (Baillet 1866), A. tate-ronae (Baylis 1928), A. ondatrae (Schulz et al., 1933), A. cantonensis (Cheng 1935), A. gubernaculatus (Dougherty 1946), A. blarini (Ogren 1954), A. soricis (Soltys 1953), A. chabaudi (Biocca 1957), A. sciuri (Merdivenci 1964), A. michiganensis (Ash 1967), A. sandarsae (Alicata 1968), A. mackerrasae (Bhaibulaya 1968), A. dyjardini (Drozd et Doby 1970), A. schmidti (Kicsella 1971), A. malaysiensis (Bhaibulaya and Cross 1971), A. costaricensis (Morera and Céspedes 1971), A. minutus (Ohabayashi et al. 1973), y A. siamensis (Ohabayashi et al. 1979). Sin embargo, sólo A. cantonensis y A. costaricensis se conocen como agentes de enfermedades en seres humanos.

A. cantonensis es el agente causal de la meningoencefalitis eosinofílica, endémica en la Cuenca Oriental del Pacífico, las islas de Hawái y el Pacífico Sur. El huésped intermediario más importante es Achatina fulica y su huésped definitivo, Rattus norvegicus y R. rattus. En Cuba, se informó de cinco casos de meningoencefalitis eosinofílica en humanos e infecciones naturales en R. norvegicus y en los moluscos Bradybaena similaris y Veronicela cubensis (Aguiar et al. 1981; Pascual et al. 1981).

A. costaricensis es el agente etiológico de la angiostrongiliasis abdominal. Esta especie fue descrita por Morera y Céspedes (1971 a y

1971 b), a partir de gusanos adultos (dos hembras y un macho), hallados en piezas quirúrgicas de humanos. Se conocen solo en huéspedes del Continente Americano, desde el Sur de los Estados Unidos hasta Brasil, Ecuador y Perú. Ubelaker y Hall (1979), encontraron un macho y dos hembras en un adulto de Sigmodon hispidus (Rodentia: Cricetidae), en Texas. Morera (1985 a) informó de la infección natural de nueve especies de roedores en Costa Rica S. hispidus, Rattus rattus, Rattus norvegicus, Liomys salvini, Tylomys watsoni, Proechimys semispinosus, Peromyscus nudipes, Oryzomys albigularis y Oryzomys caliginosus, además de un pizote (Nasua narica bullata), proveniente de la región de San Carlos (Monge et al., 1978).

En Panamá se ha encontrado infección natural en S. hispidus. R. rattus, Zygodontomys microtinus, Liomys adpersus y Oryzomys fulvescens (Tesh et al., 1973). Malek (1981) informó infección natural en Oryzomys caliginosus, en Colombia.

Morera y Ash (1970) describieron el primer huésped intermediario conocido, una babosa de la familia Veronicellidae (Gastropoda). Estudios realizados en Costa Rica demuestran que éste es el huésped intermediario más importante. Morera et al., (1983), encontraron en Ecuador infección natural de Sarasinula sp (Gastropoda: Veronicellidae).

En 1979, Camacho encontró infección natural de Helisoma trivolvis. También se han encontrado varios ejemplares de una planaria (Geoplana sp, Morera, 1986 comunicación personal). Ubelaker et al., (1981), lograron la infección experimental de Biomphalaria glabrata.

Los vermes adultos de A. costaricensis presentan cuerpo filiforme; la cutícula es transparente y lisa con estriaciones finas hacia los extremos. La parte caudal está curvada ventralmente en ambos sexos. El macho mide de 17.4 a 22.2 mm (promedio de 19.9 mm). Los testículos se observan por detrás de la unión esófago-intestino; las espículas son delgadas, estriadas e iguales y miden 0.318 a 0.330 mm. El gubernáculo consiste en dos ramas que se juntan antes de llegar a la cloaca. La bolsa copulatriz es simétrica y algo desarrollada. Los rayos ventrales están juntos excepto en su extremidad distal; el ventro lateral es ligeramente más largo que el ventro-ventral; los rayos laterales emergen de un tronco común, separados de los ventrales. El extremo dorsal nace cerca del tronco lateral y el dorsal es corto y bifurcado. La cloaca tiene forma de media luna con tres papilas posteriores a la abertura.

La hembra adulta mide de 28.2 a 42.0 mm (promedio de 32.8 mm). El esófago es ligeramente más largo que en el macho; la extremidad caudal es más o menos cónica, con una pequeña proyección en la punta. El

ano está localizado a 0.060 mm del extremo de la cola y la vulva a 0,240 a 0.290mm. El tubo uterino se inicia detrás de la unión esófago-intestinal y continúa hacia el extremo posterior rodeando el intestino en forma de espiral, hasta terminar en una corta vagina, cerca de la vulva.

En 1973 Morera describió el ciclo de vida de A. costaricensis. Los parásitos viven dentro de las arterias mesentéricas de la región cecal del huésped definitivo (Sigmodon hispidus). Aquí las hembras fecundadas ovopositan y los huevecillos son llevados por la sangre hasta los tejidos de la pared intestinal, en cuyos capilares embrionan hasta formar las larvas de primer estadio (L_1): éstas reptan hasta alcanzar la luz intestinal y salen al exterior con las heces de la rata.

El huésped intermediario es un molusco, el cual se infecta al ingerir las heces de la rata infectada. En el interior del molusco, las larvas de primer estadio migran a los tejidos del pie y del manto, donde se inmovilizan. Al segundo o tercer días después de la ingestión, las larvas se notan engrosadas y llenas de gránulos; al cuarto día ocurre la primera muda; las L_2 comienzan a aumentar de tamaño (la L_2 madura mide 0.370 mm promedio, es granulosa e inmóvil), hasta que 11 ó 14 días después de su ingestión, se realiza la segunda muda y se transforman a larvas de tercer estadio (L_3), las cuales, alrededor del décimoctavo día,

se han transformado en la forma infectante para el mamífero.

La L_3 está libre de gránulos y conserva las dos cubiertas de las dos mudas anteriores. Estas larvas pueden vivir durante períodos largos (varios meses), dentro del molusco y permanecer inactivas hasta que sean liberadas.

Las ratas sanas se infectan al ingerir L_3 presentes en el moco de un molusco infectado, o bien, cuando lo ingiere. En este último caso, el jugo gástrico digiere al molusco y se liberan las L_3 , que muestran movimientos activos ondulatorios; miden 0.472 mm promedio. El esófago mide 0.164 mm; el anillo neviroso central está situado a 0.064 mm de la extremidad caudal. En un medio húmedo y a temperatura ambiente, estas larvas conservan su vabilidad hasta por 72 horas.

Las L_3 liberadas llegan a la región ileocecal y penetran la pared intestinal, donde se localizan en los vasos y ganglios linfáticos. Aquí, ocurren dos mudas más y se transforma en el quinto estadio o adultos jóvenes; éstos migran a las arterias mesentéricas de la región cecal, donde alcanzan la madurez sexual. Las L_1 aparecen en las heces de la rata 24 días después de la infección.

El hombre se infecta al ingerir vegetales, agua o pedazos de moluscos, que contengan L_3 , y se convierte entonces en un huésped accidental

(Morera, 1986 comunicación personal). El parásito se localiza generalmente en las ramas de las arterias mesentéricas de la región ilcocecal, pero, se han observado localizaciones ectópicas en hígado (Morera et al, 1982) y testículo (Ruiz y Morera, 1983).

La angiostrongiliasis abdominal afecta principalmente a niños, pero en Costa Rica y en otros países del Continente Americano, se han encontrado también en adultos (Morera, 1985 b). El paciente comúnmente se queja de dolor en la fosa ileaca derecha y del flanco derecho, y la palpación es dolorosa. El tacto rectal es también doloroso en la mitad de los casos. La temperatura oscila entre 38 a 38.5 °C, raramente acompañada por escalofríos, con una duración promedio de 2 a 4 semanas. En la mitad de los casos se presenta anorexia y vómito.

La infección se caracteriza a menudo por la presencia de una masa tumoral que se palpa en el cuadrante inferior derecho, que fácilmente se confunde con un tumor maligno. Generalmente se presenta leucocitosis de 15.000 a 40.000 glóbulos blancos por mm³ y eosinofilia de 20 a 50%. El examen radiológico puede facilitar el diagnóstico clínico.

Debido a la importancia médica de esta enfermedad, se ha creído conveniente investigar la posibilidad de que otros moluscos puedan servir como huéspedes intermediarios de este parásito.

Como ya fue mencionado, varios miembros de la familia Lymnaeidae pueden participar en el ciclo de vida de varios helmintos diheteroxenos.

Por esta razón, el objetivo de este estudio es determinar si Lymnaea sp puede servir como huésped intermediario de A. costaricensis.

Centro Universitario Regional del Atlántico de la Universidad de Costa Rica.

Costa Rica. Se mantuvieron en helado a 4°C hasta el momento de su uso.

Se instalaron en acuarios que se mantuvieron a 25°C y se les suministró una dieta de hojas de papaya y de caña.

La producción de huevos en el laboratorio se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron en acuarios con agua dulce y se les suministró una dieta de hojas de papaya y de caña.

Después de 24 horas se observó la salida de los huevos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 48 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 72 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 96 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 120 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 144 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 168 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 192 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 216 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 240 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 264 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

Después de 288 horas se observó la salida de los gusanos y éstos se colocaron en un frasco con agua.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó de julio de 1985 a marzo de 1986, en el Laboratorio de Parasitología del Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios.

Se utilizaron caracoles (Lymnaea sp) recolectados en la pileta del Centro Universitario Regional del Atlántico en Turrialba, Universidad de Costa Rica. Se transportaron en bolsas plásticas con agua al laboratorio, donde se instalaron en acuarios que se mantuvieron a temperatura ambiente; se les suministró una dieta de hojas de repollo y lechuga.

La producción de huevos está en función del tamaño (edad) del caracol y éste se considera adulto cuando se encuentra sexualmente maduro (Boag, 1979). En el laboratorio se observó que en esta especie la producción de huevos se inició cuando la concha alcanzó una longitud promedio de 4.8 mm, así que se consideraron adultos aquellos caracoles cuya longitud de la concha fue mayor a 5.0 mm. La longitud de la concha de los caracoles juveniles expuestos osciló entre 1.3 y 2.7 mm.

Las ratas de milpa (Sigmodon hispidus) se infectaron con larvas de tercer estadio de A. costaricensis. Después del período prepatente, se separaron las L₁, colocando las heces de la rata sobre gasa en un embudo, según el método Baermann. Las larvas por presentar geotropismo

positivo, bajan al fondo del embudo, cuyo extremo tiene un tubo de hule cerrado por una prensa de pinza. Se recogió en un beaker de 50 ml el sedimento que se deposita en el fondo del embudo y se diluyó con un poco de agua. El número de L_1 empleadas en cada fase del trabajo, se calculó contando las contenidas en una alícuota de 1 ml de este sedimento; para esto, se usó una caja de Petri cuadrículada de 5 cm de diámetro.

Para determinar si Lymnaea sp es susceptible a la infección con A. costaricensis, se colocaron grupos de 10 caracoles adultos (7.23 mm promedio largo de la concha), en 4 bandejas plásticas de 12 cm de largo por 8 cm de ancho por 6.5 cm de alto. Se agregó agua declorinada y se taparon con un cedazo de malla fina, para evitar la fuga. Los moluscos se mantuvieron en ayunas 24 horas antes y durante los tres días de su exposición a las L_1 .

Con el propósito de aumentar la probabilidad de infección en los moluscos, en horas de la mañana del primer día de exposición, se agregó agua a las bandejas, de tal manera que cubriera el fondo. Luego, se suministró una dosis de 400 L_1 por caracol (4.000 larvas por bandeja), a tres de ellas y la restante se utilizó como testigo. Ocho horas más tarde, se agregó agua a cada bandeja, para restablecer las condiciones normales de laboratorio. El segundo y tercer días de exposición, se siguió

el mismo procedimiento, pero en la tarde del tercer día, se colocó alimento en las bandejas, el cual se siguió suministrando diariamente.

Seis días después de la exposición, se tomaron dos caracoles de cada bandeja y se les midió el largo, ancho y abertura de la concha. Para comprobar la infección y el estadio larval, cada caracol se colocó en una licuadora y se agregó 10 ml de jugo gástrico artificial (pepsina 5 g, ácido clorhídrico 7 ml y agua 100 ml), según el método de Wallace y Rosen (1969). La licuadora se puso a máxima velocidad durante 1 minuto, hasta que no se observaron restos de tejido. El licuado se vació en un frasco erlemeyer de 250 ml; las paredes y las espas de la licuadora se lavaron con la solución de pepsina y el producto del lavado se agregó también al frasco erlemeyer; posteriormente se colocó en la estufa a 37 °C durante una hora. Luego, el contenido del frasco se trasladó a un aparato de Baermann, para separar las larvas.

Después de 24 horas, se colocaron aproximadamente 5 ml de sedimento del embudo de Baermann, en una caja de Petri cuadrada de 5 cm de diámetro. Cada cuadrado de 5 mm se observó al microscopio estereoscópico, se identificaron y se contaron las larvas. Para la identificación del estadio larval, varios ejemplares se colocaron en un porta-objetos con la ayuda de una pizeta Pasteur y se observaron al microscopio

de luz.

Al décimo tercer día, se examinaron dos caracoles de cada bandeja y al vigésimo sexto día los restantes, empleando el mismo procedimiento. En los casos en que murieron caracoles antes o después de las fechas indicadas, se estudiaron con el citado procedimiento. Igualmente se examinó un caracol que murió al décimo cuarto día. Como las larvas obtenidas tenían una morfología similar a las L₃ de A. costaricensis, se inocularon mediante sonda gástrica en una rata de milpa (S. hispidus), para comprobar el diagnóstico morfológico.

Una vez que se comprobó la susceptibilidad de Lymnaea sp, a la infección con A. costaricensis, se realizaron tres ensayos. El primero consistió en determinar si existe diferencia en la susceptibilidad del caracol a la infección, empleando varias dosis: 200, 400, 600 y 800 L₁ por caracol, durante tres días de exposición. Se expusieron 10 caracoles adultos (7.83 mm promedio largo de la concha), a cada una de las dosis mencionadas, siguiendo el procedimiento descrito. Uno de los caracoles expuestos a 600 L₁ por caracol, se examinó al vigésimo sexto día después de la exposición. De las larvas obtenidas, 50 se inocularon en una rata, para comprobar si eran de A. costaricensis.

En el segundo ensayo, se determinó si hay diferencia en la infección

al variar el tiempo de exposición a las L_1 : 24, 48 y 72 horas. En cada caso se emplearon 10 caracoles adultos nacidos en laboratorios (7.15 mm promedio largo de la concha) y se expusieron a 400 L_1 por caracol, siguiendo el procedimiento ya descrito.

Con el objeto de probar que las larvas obtenidas de los caracoles eran de A. costaricensis, se inocularon dos ratas con 50 L_3 cada una. Para esta prueba, se usaron caracoles infectados durante 72 horas, 26 días antes.

Finalmente, para determinar se existe diferencia en la susceptibilidad a la infección con A. costaricensis, entre caracoles juveniles y caracoles adultos, cuatro grupos de 10 caracoles juveniles nacidos en laboratorio (42 días de nacidos), se expusieron a 400 L_1 por caracol, durante tres días. Los resultados obtenidos, se compararon con los datos de la primera infección de caracoles adultos expuestos a la misma dosis. El examen de este grupo de moluscos, se hizo al sexto, décimo tercer y vigésimo sexto días de expuestos a las L_1 . Después de medir el largo, ancho y abertura de la concha, cada caracol se aplastó entre dos láminas de vidrio y se colocó en un frasco erlemeyer, con la ayuda de una pizeta que contenía solución de pepsina. Con el mismo líquido se lavaron los vidrios y el producto del lavado también se agregó al frasco.

La digestión de los tejidos se hizo con la ayuda de un agitador magnético, hasta que no se observaron fragmentos del molusco.

El contenido del frasco elermeyer, se colocó en un aparato de Baermann y se examinó siguiendo el método ya descrito, para la identificación y conteo de los estados larvales.

Las 8 L₂ que se obtuvieron de la digestión del vigésimo primer día y 50 L₃ del vigésimo sexto día, se inocularon en ratas, para la comprobación de la especie. Todas las ratas inoculadas, se sacrificaron después de transcurrido el período prepatente, para la búsqueda de los vermes adultos.

Con el propósito de estudiar la posible reacción del huésped y la localización de las larvas en los tejidos, 8 caracoles se expusieron a una dosis de aproximadamente 1'000 larvas por caracol, bajo las condiciones ya mencionadas. Al vigésimo sexto día de la exposición, los moluscos se narcotizaron, colocándolos en una solución de nicotina, para relajar los tejidos y extraerlos de la concha. Después de 24 horas, se fijaron en F.A.A. (formalina, alcohol y ácido acético). Los tejidos se incluyeron en parafina, se cortaron a 6 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina e impregnación argéntica de Laidlaw.

Para determinar si los moluscos infectados, eliminan espontáneamente L_3 , 5 caracoles adultos nacidos en laboratorio, se expusieron a 1000 L_1 durante tres días, con el procedimiento ya descrito. Al vigésimo sexto día después de la infección, durante veinte días se recogió el agua de la bandeja que contenía los caracoles y se colocó en un aparato de Baermann. Veinticuatro horas más tarde, se examinó el sedimento del embudo, para la búsqueda de L_3 .

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos, se realizó empleando un análisis de variancia de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis. Para establecer si existe relación entre el largo de la concha y el número de larvas obtenidas, se aplicó una regresión lineal simple. Estas pruebas pertenecen al paquete estadístico Stagra-phics versión 1.0.

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

RESULTADOS

Se puede observar en el cuadro 1, que de 29 caracoles adultos expuestos a 400 L_1 de A. costaricensis, se encontraron 11 infectados. Entre los primeros dieciocho días post-exposición, murieron 12 caracoles del total expuestos, 12 de los cuales no se infectaron. El total de larvas obtenido fue de 422 (promedio de 38.9 ± 40.4 larvas).

La susceptibilidad del molusco a la infección, empleando diferentes dosis (200, 400, 600 y 800 L_1 por caracol), no presenta diferencia significativa ($P > 0.05$). Al comparar los datos obtenidos al utilizar las dosis de 200 y 800 L_1 por caracol, tampoco se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$).

En el cuadro 2 se observa mayor mortalidad (8 caracoles), con la dosis de 400 L_1 y menor mortalidad (2 caracoles), con la dosis de 200 L_1 por caracol. Con esta última dosis, se obtuvieron más caracoles infectados (7), mientras que con las otras dosis, el número de caracoles infectados fue el mismo (cuadro 4). El mayor número de larvas se obtuvo al exponer los moluscos a 600 L_1 por caracol (promedio de 111.5 larvas por caracol).

Al variar el tiempo de exposición a L_1 (24, 48 y 72 horas), no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$), en la susceptibilidad de Lymnaea sp a la infección. En el cuadro 3, se nota que la exponer caracoles

adultos nacidos en el laboratorio a L_1 , la mortalidad disminuye, comparada con la obtenida en el cuadro 1. La muerte de estos moluscos ocurrió al vigésimo día. Todos los caracoles expuestos durante 24 horas resultaron infectados, pero el grado de infección fue mayor en 72 horas de exposición, período en el cual se obtuvo mayor número de larvas (promedio de 169.1). El total de larvas que se encontró fue de 515, 221 y 1.353 para 24, 48 y 72 horas respectivamente (cuadro 5).

La mortalidad de los caracoles juveniles nacidos en el laboratorio es baja (cuadro 6). De los 31 caracoles expuestos durante 3 días a 400 L_1 por caracol, 5 murieron al quinto día post-exposición. Al comparar estos resultados con los obtenidos con caracoles adultos expuestos a la misma dosis, sí se encontró diferencia significativa ($P < 0.01$): en el cuadro 7 se observa que se infectaron más caracoles juveniles que adultos (26 y 11 respectivamente). El número de L_3 activas encontradas en los adultos fue 114 (27.4%), en tanto que en los juveniles sólo se encontraron 9 (3.4%).

En los caracoles adultos colectados en el campo (cuadro 1 y 2), se comenzaron a observar L_3 a partir del décimo segundo día de digestión, mientras que en los nacidos en el laboratorio (cuadro 3), se observaron a partir del vigésimo día, (excepto uno, donde se encontraron L_3 al décimo

tercer día). En estos últimos, las L_3 se notaron inactivas (enroscadas) en su gran mayoría.

En el cuadro 6 se puede observar que en los caracoles juveniles nacidos en el laboratorio, digeridos al vigésimo sexto día (excepto uno), se encontraron L_2 , hecho que no se observó en los caracoles adultos colectados en el campo (cuadro 2), ni en los nacidos en el laboratorio (cuadro 3). Además, el número de L_2 fue similar al de L_3 . Estas L_3 estaban inactivas (enroscadas) en su gran mayoría.

Una muestra de 10 caracoles colectados en el campo y otros 10 empleados como testigo, se examinaron y no se encontró infección natural en ninguno.

En el análisis de la regresión lineal simple entre el largo de la concha y el número de larvas, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.2805. Esto indica que a mayor largo de la concha, mayor número de larvas, lo que concuerda con los datos obtenidos.

Se recuperaron parásitos adultos solamente en ratas (S. hispidus), que fueron inoculadas con las L_3 de A. costaricensis obtenidas de caracoles digeridos al vigésimo sexto día de la exposición a L_1 (cuadro 8).

En los cortes histológicos de los caracoles con 26 días de infección, se observó que las larvas se localizan en los tejidos del manto y del pie; no se observó ningún tipo de célula fagocítica rodeando las larvas, ni alteración en los tejidos que indicaran reacción celular del huésped hacia el parásito. (Figura 1 y 2).

La impregnación argéntica de Laidlaw no mostró fibras reticulares alrededor de las larvas, pero sí se observó argirofilia en la cutícula. Además, esta cubierta se observó bien teñida en la mayoría de los casos, lo que indica ausencia de reacciones celulares por parte del huésped contra el parásito.

Al examinar el agua de la bandeja que contenía los caracoles con 26 días de infección, sólo se encontró una L_3 eliminada naturalmente.

DISCUSION

En general, las infecciones en las labas de *Lymnaea* sp. sugiere que este caracol podría ser un huésped intermediario natural, potencialmente importante desde el punto de vista epidemiológico. Si se toma en cuenta la relación largo de la concha/número de larvas, este caracol puede ser más susceptible a la infección de *A. costaricensis*, que *Pomacea flagellata* (Briceño, 1986 comunicación personal) y *Helisoma trivolvis* (Camacho, 1979).

En la parte inicial de este estudio se observó alta mortalidad y una baja tasa de infección en los caracoles adultos; esto se debió quizás, a que la exposición se hizo cinco días después de colectados y por lo tanto, el tiempo transcurrido no fue apropiado para adaptarse a las condiciones del laboratorio. Probablemente, la falta de adaptación, pudo disminuir el "apetito" de los moluscos, lo que explicaría que, sólo 11 caracoles se infectaron. Además, el número de larvas encontrado fue bajo (máximo 110), comparado con las obtenidas en caracoles adultos nacidos en el laboratorio (máximo 414).

Tampoco se puede explicar la alta mortalidad (21 caracoles) con base en los daños tisulares producidos por la penetración de las L₁, ya que 12 caracoles muertos no estaban infectados.

En general, las diferencias en las tasas de la infección pueden deberse en parte, a las diferencias en los hábitos alimentarios específicos e individuales, ya que durante la exposición algunos ejemplares se mantuvieron flotando, mientras otros estaban "raspando" en el fondo de la bandeja, donde estaban las larvas.

El ámbito de 200 L_1 entre las dosis a las cuales fueron expuestos los moluscos, probablemente fue pequeño, ya que la diferencia no es significativa. Inclusive, la probabilidad de que un caracol encontrara e ingeriera una larva, fue la misma al emplear dosis de 200 o de 800 L_1 por caracol, porque la diferencia entre estas dosis no es significativa. Esto indica que, las diferencias en la mortalidad, número de caracoles infectados y el número de larvas obtenidas, fue debida al azar y no a las dosis empleadas. Lo mismo ocurrió al variar el período de exposición, las diferencias son debidas al azar y no a los períodos de exposición utilizados.

En los caracoles adultos nacidos en el laboratorio se notó disminución en la mortalidad, si se compara con la obtenida en los caracoles colectados en el campo (cuadro 1 y 2). Sin embargo, en este caso tampoco se puede atribuir la muerte de los caracoles a los daños tisulares

producto de la penetración de L_1 , pues solo uno de cuatro caracoles se encontró infectado con pocas larvas (24), en contraste con el máximo número de larvas obtenidas (414) en un caracol vivo.

Al comparar la tasa de infección entre caracoles adultos y juveniles, sí se encontró diferencia significativa. El número de adultos infectados fue bajo (37.9%), mientras que en los juveniles fue de 83.9% (cuadro 7). Sin embargo, a pesar de que se infectaron menos adultos, la intensidad de la infección fue mayor (\bar{X} : 38.4 ± 40.0 larvas), si se compara con la de los juveniles (\bar{X} : $15.7 \pm 17,3$ larvas). En los juveniles el máximo de larvas encontradas fue 60, número que realmente no fue tan bajo, si tomamos en cuenta su pequeño tamaño (\bar{X} : 2.72 ± 1.03 mm).

Briceno (1986 comunicación personal) encontró que al exponer Pomacea flagellata a A. costaricensis, se infectaron más caracoles cuya concha fue $\bar{X} = 0.98$ cm que aquellos de $\bar{X} = 2.95$ cm (66,6% y 33.3% respectivamente). Conejo (1985) informa que las babosas (Veronicellidae) de mayor peso, se encuentran más frecuentemente infectadas con este parásito, que las de menor peso.

Bouix-Busson y colaboradores (1984), al infectar experimentalmente L. glabra y L. trunculata con Fasciola hepatica, también obtuvieron mayor número de adultos infectados (adultos no infectados de L. glabra

4.9% y L. trunculata 3.8%, en tanto que el porcentaje de juveniles no infectados, fue de 25% y 17.8% respectivamente).

En el grupo de caracoles colectados en el campo, se encontraron larvas con morfología similar a las L₃ de los días al décimo segundo, décimo tercer y décimo cuarto día (cuadro 1 y 2). Morera (1973) informa la presencia de L₃ en Veronicellidae entre 13 - 18 días post-exposición, sin embargo, la madurez (infectividad) de estas larvas, solo se logra 18 días después de la infección del molusco. De hecho, las larvas obtenidas de uno de los caracoles e inoculadas en una rata, no se transformaron en adultos. En los caracoles adultos nacidos en el laboratorio, las L₃ se observaron a partir del vigésimo día (cuadro 3). Rachford (1976 a), al infectar L. palustris con A. cantonensis, observó que el crecimiento larval fue normal, pero con un patrón de desarrollo más rápido. El tercer estadio larval fue alcanzado al décimo segundo día después de iniciada la infección, aunque frecuentemente, este estadio no se logra sino hasta 14 - 21 días post-exposición. Sin embargo, el autor no aclara si las larvas eran infectantes para el mamífero.

En la digestión de caracoles adultos colectados en el campo realizada el vigésimo sexto día pos-exposición, se obtuvo 27.4% L₃ activas. Esta observación, sumada al hecho de que en caracoles adultos nacidos

en el laboratorio se encontraron L_3 hasta el vigésimo día post-exposición, sugiere la posibilidad de que algunos de los moluscos colectados en el campo, venían infectados naturalmente.

Es evidente que en los caracoles juveniles, el desarrollo larval es más lento (cuadro 6); quizás, sus procesos bioquímicos y fisiológicos difieren con respecto a los de los adultos. Aunque aparentemente las larvas de A. costaricensis no se "alimentan" en su huésped intermediario, debe haber algún "intercambio de sustancias" huésped-parásito a través de la cutícula; si en los juveniles estas "sustancias" se encuentran ausentes o en bajas concentraciones, el desarrollo larval posiblemente se retrasa.

Se recuperaron parásitos adultos de A. costaricensis solo de ratas inoculadas con L_3 activas provenientes de caracoles adultos. Esto sustenta la hipótesis de la posible "deficiencia o ausencia de sustancias" en los caracoles juveniles, necesarias para el desarrollo larval, ya que de las dos ratas inoculadas con L_3 (cuadro 8) de caracoles juveniles, sólo se recuperó un parásito adulto, lo que podría significar que a pesar de obtener L_3 en caracoles juveniles, éstas no tienen los requerimientos y condiciones necesarias para realizar dos mudas más y transformarse en adultos en la rata. El número de parásitos adultos/rata (14-30), es similar al obtenido en ratas inoculadas con L_3 de este mismo parásito, obtenidas de

babosas de la familia Veronicellidae (considerado el huésped intermedio más importante), donde el promedio de parásitos recuperados es de 54%. En P. flagellata se recuperaron 3 parásitos adultos de 50 L₃ inoculadas.

El estudio de los cortes histológicos no mostró la presencia de amebocitos alrededor de las larvas, (Figura 2) lo que puede sugerir que no existe un mecanismo de defensa celular. L. stagnalis, como otros moluscos, tiene un sistema de defensa bien desarrollado (Smnia, 1979); las células presentes en la sangre, son fagocíticas. Su sistema de defensa innato le permite reconocer y eliminar de su circulación partículas bióticas o abióticas (Knaap et al. 1982).

El origen y los mecanismos de acción de los fagocitos, no están totalmente esclarecidos. Sin embargo, las larvas son rodeadas inicialmente por amebocitos y posteriormente son encapsuladas. La acumulación de células y la formación de cápsula, puede brindar cierto grado de protección a la larva contra metabolitos u otras sustancias que podrían serle perjudiciales (Rachford, 1976 b).

Se han encontrado acumulación de amebocitos y fibroblastos alrededor de larvas de A. cantonensis en Biomphalaria glabrata (Richards y Merrit, 1967), alrededor de las de A. costaricensis en babosas (Conejo

1985) y en P. flagellata (Briceño 1986 comunicación personal).

En los cortes histológicos con impregnación argéntica se observó la cutícula de las larvas de A. costaricensis sin daño aparente. Esto podría indicar que en esta especie no existe agresión por parte de amebocitos, ni formación de cápsulas. Tampoco se apreció daño en los tejidos del molusco. Se puede suponer entonces que en lugar de una relación parasitaria, estamos en presencia de un comensalismo o inquilinismo (del latín *incolere*, "vivir en").

Se podría decir que hay equilibrio en la relación entre las larvas de A. costaricensis y Lymnaea sp. Las larvas aparentemente no dañan al caracol, lo que necesitan en un "espacio" para continuar su desarrollo larval y eventualmente fuera de él, transformarse en parásitos adultos en el huésped definitivo. ¿A qué obedece ésta relación? ¿Será que a este llamado comensalismo se llegó después de mucho tiempo, a través de un proceso de "entendimiento" entre el huésped y el parásito? O bien, ¿la relación de equilibrio entre estas dos especies se estableció desde el principio?. Además, no parece haber cambios en la actividad de los caracoles infectados; parece ser igual a la observada en los caracoles sanos.

Sin embargo, algunos parásitos pueden alterar las actividades

normales del huésped. Por ejemplo, en L. catascopiun infectado con larvas de Schistosomatiun douthitti, la ovoposición fue inhibida (Loker, 1979). Se observó disminución en la actividad normal y en el crecimiento de Lymnaea tomentosa infectada con Fasciola hepática (Stpieznska, 1979).

1. La tasa de infección obtenida al someter a L. tomentosa a un baño de agua infectada con Fasciola hepática fue del 100%.
2. El estudio de los cortes histológicos indica que Lymnaea tomentosa no desarrolló lesiones de resistencia al parasitismo.
3. En vista de la demostrada capacidad de L. tomentosa de sobrevivir en el agua de la zona de estudio en Costa Rica es probable que exista una transmisión de Fasciola hepática al hombre y animales domésticos y salvajes. Este hallazgo debe ser considerado como un estímulo para el estudio de esta parásita al hombre.

CONCLUSIONES

1. La infección experimental de Lymnaea sp con A. costaricensis mostró que este caracol es susceptible a la infección.
2. Al emplear dosis de 200, 400, 600 y 800 L₁/caracol y diferentes períodos (24, 48 y 72 horas) de exposición con A. costaricensis, no se obtuvieron diferencias significativas.
3. La tasa de infección obtenida al exponer caracoles adultos y juveniles a 400 L₁/caracol durante tres días, presenta diferencia significativa.
4. El estudio de los cortes histológicos indica que, aparentemente, Lymnaea sp., no desarrolló mecanismos de resistencia contra el parásito.
5. En vista de la demostrada capacidad de Lymnaea sp., de servir de huésped intermediario de A. costaricensis, unida al hecho de que se encuentra en Costa Rica en hábitats de aguas continentales, donde el hombre realiza diversas actividades y hasta utiliza sus recursos, estamos con este hallazgo ante una nueva posibilidad de transmisión de este parásito al hombre.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar si Lymnaea sp., puede servir como huésped intermediario de A. costaricensis.

Al comparar la tasa de infección de caracoles adultos y juveniles, expuestos a la misma dosis, se encuentra diferencia significativa. El porcentaje de adultos infectados fue de 37.9% mientras que el de juveniles fue 83.9%. Sin embargo, la intensidad de la infección fue mayor en los caracoles adultos (\bar{X} : 38.4 larvas), en contraste con la de los juveniles (\bar{X} : 15.7 larvas).

Al emplear dosis de 200, 400, 600 y 800 L₁/caracol y diferentes períodos de exposición (24, 48 y 72 horas), no se obtuvo diferencias significativas.

El estudio de los cortes histológicos indican que las larvas de A. costaricensis se localizan en el pie y manto del caracol y que aparentemente, Lymnaea sp., no desarrolló mecanismos de resistencia contra el parásito.

La infección experimental de Lymnaea sp., indica que este caracol puede ser un huésped intermediario natural, potencialmente importante, desde el punto de vista epidemiológico.

Cuadro 1: Número de larvas de *A. costaricensis* en *Lymnaea* sp adultos colectados en el campo, expuestos a 400 L₁/caracol durante tres días en el Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ABERTURA (mm)	DIAS*	L ₁	L ₂	L ₃	TOTAL LARVAS
- +	-	-	1	0	0	0	0
- +	-	-	2	0	0	0	0
9.5 +	4.2	5.3	5	0	0	0	0
-	-	-	6	0	0	0	0
- +	-	-	6	0	0	0	0
-	-	-	6	0	0	0	0
- +	-	-	6	0	0	0	0
-	-	-	6	0	0	0	0
-	-	-	6	0	0	0	0
7.5 +	3.5	5.7	7	0	0	0	0
8.7 +	3.7	6.1	7	0	0	0	0
8.5 +	3.3	4.9	11	0	0	0	0
7.3 +	2.9	4.1	11	0	0	0	0
6.2 +	2.4	3.8	11	0	0	0	0
6.6 +	3.1	3.9	11	0	0	0	0
7.4 +	3.0	4.7	12	0	1	2	3
7.2 +	2.6	4.4	12	0	0	0	0
6.4	2.6	4.0	13	0	0	0	0
6.2	2.3	3.5	13	0	0	14	14
8.4 +	4.0	-	14	0	0	2	2
7.3 +	2.5	4.5	14	0	0	60	60
6.8 +	3.1	4.9	18	0	0	8	8
5.7 +	2.1	3.5	18	0	0	13	13
6.7 +	2.6	4.3	18	0	2	32	34
7.4 +	3.0	5.7	18	1	0	109	110
6.1 +	2.4	3.5	18	0	0	6	6
7.9 +	3.6	5.0	18	0	1	99	100
7.9	3.0	4.8	18	0	0	0	0
6.2	2.0	3.7	20	0	0	72	72
TOTAL				1	5	416	422
\bar{X}	7.23	2.99	4.56				38.4
S	0.99	0.66	0.79				40.4

* Número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

+ Caracol muerto.

Cuadro 2: Número de larvas de *A. costaricensis* en *Lymnaea* sp. adultos colectados en el campo y expuestos a 200, 400, 600 y 800 L₁/caracol durante tres días en el Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

DOSIS	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ABERTURA (mm)	DIAS*	L ₁	L ₂	L ₃	TOTAL LARVAS
200 +	8.2	3.8	5.3	5	0	0	0	0
200	8.4	3.6	4.9	6	0	0	0	0
200	6.5	2.7	3.9	6	0	0	0	0
200	9.2	4.2	6.7	13	0	3	36	39
200	9.0	3.2	6.8	13	0	1	21	22
200 +	7.0	2.9	4.6	21	0	1	35	36
200	7.6	2.7	4.9	26	0	0	31	31
200	9.9	3.9	6.9	26	0	0	26	26
200	7.8	3.6	5.2	26	0	0	30	30
200	6.3	2.3	3.5	26	0	0	10	10
400	7.5	3.0	4.1	6	0	0	0	0
400	6.5	2.4	3.6	6	0	0	0	0
400 +	8.6	3.0	5.8	13	0	1	0	1
400 +	6.1	3.0	4.2	13	0	0	0	0
400 +	8.8	3.7	-	13	0	0	0	0
400 +	9.0	4.2	5.9	13	0	0	0	0
400 +	9.5	3.4	6.6	13	0	0	0	0
400 +	9.4	3.7	5.7	15	0	2	57	59
400 +	8.3	3.2	4.5	15	0	6	24	30
400 +	6.8	2.7	3.8	15	0	2	10	12
600 +	6.0	2.9	4.3	4	0	0	0	0
600 +	8.2	3.8	5.4	4	0	0	0	0
600 +	8.8	4.0	5.7	5	0	0	0	0
600 +	7.2	3.1	4.0	5	0	0	0	0
600	6.4	2.3	3.3	6	0	0	0	0
600	7.1	3.5	4.1	6	0	0	0	0
600	8.8	3.8	5.7	13	0	7	24	31
600	8.8	3.8	5.7	13	0	1	11	12
600	6.5	3.0	4.4	13	0	0	11	12
600	8.6	3.7	5.7	26	0	0	229	229
600	7.8	3.0	4.6	26	0	0	174	174
800 +	9.2	4.0	6.1	5	0	0	0	0
800 +	9.2	4.5	6.1	5	0	0	0	0
800	6.9	2.6	3.9	6	0	0	0	0
800	6.2	2.1	3.2	6	0	0	0	0
800 +	-	-	-	13	0	0	0	0
800 +	-	-	-	13	0	1	0	1
800 +	-	-	-	19	0	0	0	0
800	7.7	7.8	8.7	26	0	0	130	130
800	6.2	3.4	3.6	26	0	0	99	99
800	8.4	5.1	5.7	26	0	0	130	130
\bar{X}	7.83	3.45	5.04					
S	1.16	0.99	1.24					

* Número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.
+ Caracol muerto.

Cuadro 3: Número de larvas de *A. costaricensis* en *Lymnaea* sp adultos nacidos en el laboratorio y expuestos a 400 L₁/caracol durante 24, 48 y 72 horas, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

PERIODO DE EXPOSICION	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ABERTURA (mm)	DIAS*	L ₁	L ₂	L ₃	TOTAL LARVAS
24	5.7	2.4	3.3	7	3	2	0	5
24	5.0	2.0	3.0	7	9	8	0	17
24	7.0	2.4	4.0	14	0	3	0	3
24	6.0	2.4	3.3	14	0	11	0	11
24 +	-	-	-	20	0	21	3	24
24	9.5	4.0	6.6	28	0	0	168	168
24	8.5	3.1	5.6	28	0	0	81	81
24	6.6	2.4	4.2	28	0	0	48	48
24	7.0	3.0	3.8	28	0	0	88	88
24	7.7	3.0	4.8	28	0	0	94	94
48 +	7.0	2.3	4.3	6	0	0	0	0
48	5.3	2.0	3.2	6	0	0	0	0
48	6.5	3.3	5.1	7	0	0	0	0
48	8.2	3.2	5.6	13	0	14	0	14
48	5.9	2.8	4.2	13	0	6	0	6
48	6.8	2.3	3.9	20	0	2	0	2
48	6.0	2.4	3.5	27	0	0	34	34
48	8.9	3.7	6.2	27	0	0	93	95
48	9.7	4.7	6.6	27	0	0	54	54
48	10.9	4.6	7.8	27	0	0	16	16
72 +	5.2	1.9	3.0	5	0	0	0	0
72 +	6.6	2.4	-	5	0	0	0	0
72	5.0	1.6	3.2	6	30	16	0	46
72	6.8	2.7	4.5	13	0	26	3	29
72	6.4	2.2	4.0	13	0	6	0	6
72	7.0	3.0	5.2	26	0	0	290	290
72	6.4	2.0	4.0	26	0	0	128	128
72	8.9	3.0	6.1	26	0	0	396	396
72	9.7	4.0	6.7	26	0	0	414	414
72	7.0	2.4	5.9	26	0	0	44	44
\bar{X}	7.15	2.80	4.70					
S	1.55	0.79	1.33					

* Número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

+ Caracol muerto.

Cuadro 4: Larvas de *A. costaricensis* y número de caracoles adultos infectados colectados en el campo, expuestos a 200, 400, 600 y 800 L₁/caracol durante tres días, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

DOSIS	NUMERO CARACOLES EXPUESTOS	NUMERO CARACOLES INFECTADOS	TOTAL LARVAS	PROMEDIO LARVAS
200	10	7	194	27.7
400	10	4	109	27.8
600	10	4	446	111.5
800	10	4	229	57.3

Cuadro 5: Larvas de *A. costaricensis* y número de caracoles adultos infectados, nacidos en el laboratorio, expuestos a 400 L₁/caracol durante 24, 48 y 72 horas, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

HORAS	NUMERO CARACOLES EXPUESTOS	NUMERO CARACOLES INFECTADOS	TOTAL LARVAS	PROMEDIO LARVAS
24	10	10	515	51.5
48	10	7	221	31.6
72	10	8	1.353	169.1

Cuadro 6: Número de larvas de *A. costaricensis* en *Lymnaea* sp juveniles nacidos en el laboratorio, expuestos a 400 L₁/caracol durante tres días, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ABERTURA (mm)	DIAS*	L ₁	L ₂	L ₃	TOTAL LARVAS
2.5 +	0.6	0.9	5	15	4	0	19
1.8 +	0.4	0.8	5	7	3	0	10
2.7 +	0.6	1.0	5	8	2	0	10
1.3 +	-	-	5	0	0	0	0
2.0 +	0.2	0.5	5	2	1	0	3
2.2	0.4	0.7	6	1	5	0	6
2.2	0.4	0.6	6	0	1	0	1
1.7	0.3	0.6	6	0	1	0	1
1.8	0.3	-	6	1	1	0	2
1.6	0.3	1.5	13	0	0	0	0
2.7	0.4	1.6	13	0	0	0	0
2.0	0.5	0.5	13	0	0	0	0
2.0	0.6	0.4	13	0	0	0	0
2.4	0.5	0.6	13	0	5	0	5
1.6	0.2	0.7	13	0	2	0	2
3.4	0.7	1.8	21	0	0	3	3
3.3	0.9	1.9	21	0	12	1	13
2.0	0.7	0.6	21	0	3	5	8
4.6	2.0	2.4	26	0	0	8	8
3.0	0.8	1.6	26	0	6	54	60
2.3	0.8	0.9	26	0	1	7	8
1.5	0.2	0.8	26	0	12	46	58
4.2	1.3	1.8	26	0	5	5	19
5.0	1.9	2.9	26	0	6	16	22
4.9	1.6	2.8	26	0	13	15	28
4.0	1.3	2.2	26	0	5	3	8
3.6	0.9	1.2	26	0	0	7	7
2.9	0.9	1.2	26	0	5	5	10
3.5	1.3	1.6	26	0	2	24	26
3.2	1.2	1.5	26	0	13	42	55
2.5	0.7	0.9	26	0	4	22	26
TOTAL				34	112	263	409
\bar{X}	2.72	0.76	1.27				15.7
S	1.03	0.50	0.70				17.3

* Número de días transcurridos entre la exposición y la digestión.

+ Caracol muerto.

Cuadro 7: Número y porcentaje de L₃ activas e inactivas y de Lymnaea sp adultos colectados en el campo y de juveniles nacidos en el laboratorio, expuestos a 400 L₁/caracol durante tres días, Laboratorio de Parasitología, Hospital San Juan de Dios.

40

	CARACOLES EXPUESTOS	CARACOLES INFECTADOS		TOTAL LARVAS	PROMEDIO LARVAS	TOTAL L ₃			
	N°	N°	%			ACTIVAS	%	INACTIVAS	%
ADULTOS	29	11	37.9	422	38.4	114	27.4	302	72.6
JUVENILES	31	26	83.9	409	15.8	9	3.4	254	96.6

Cuadro 8: Número de adultos de *A. costaricensis* recuperados en ratas (*Sigmodon hispidus*) inoculadas con L₃ obtenidas de caracoles infectados experimentalmente.

DOSIS (L ₁ /CARACOL)		DIA DE DI- GESTION	N° L ₃ ACTIVAS	INOCULA- DA INAC - TIVA	DIA QUE SE SACRIFICO RATA	N° ADUL- TOS RECU- PERADOS
400	*	14	2	58	51	0
600	*	26	50	0	30	30
400	**	21	2	6	48	0
400	**	26	9	41	42	1
400	***	26	50	0	30	24
400	***	26	50	0	60	14

* Caracoles adultos colectados en Turrialba.

** Caracoles juveniles nacidos en el laboratorio.

*** Caracoles adultos nacidos en el laboratorio.

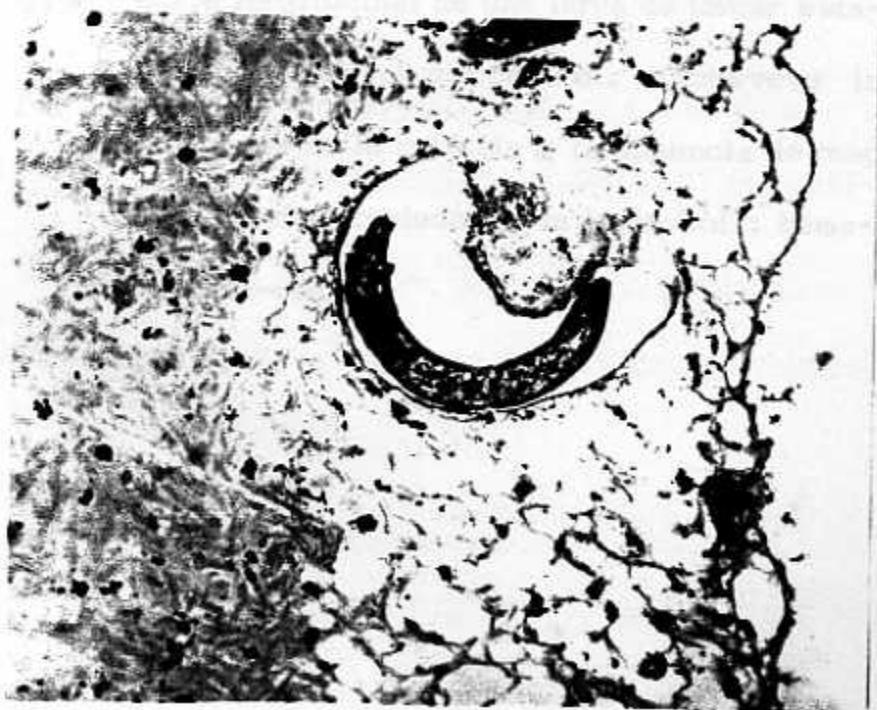


Fig. 1 Corte de un caracol infectado. En los cortes transversales de la larva de tercer estadio se puede observar la integridad de la cutícula; en algunas de las larvas se pueden observar dos pequeñas estructuras en forma diminutas espinas que corresponden a las alas laterales de las larvas. Col.: hematoxilina-eosina.
250 X.

Fig. 2 Corte longitudinal de una larva de tercer estadio en los tejidos del caracol. Obsérvese la integridad de la cutícula y la ausencia de reacción celular alrededor de la larva Col.: hematoxilina-eosina.
250 X.

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, P. H.; P. Morera, and J. Pascual. 1981. First record of Angiostrongylus cantonensis in Cuba. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (5): 963-965.
- Ash, L. R. 1967. Angiostrongylus michiganensis sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea), a lungworm occurring in the shrew, Sorex cinereus cinereus, in Michigan. *J. Parasitol.* 53 (3): 625-629.
- Bhaibulaya, M. 1979. Morphology and taxonomy of mayor Angiostrongylus species of Eastern Asia and Auatralia. In: *Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia*, Cross, J. H. (ed), U.S. Naval Medical Research Unit #2, Taipei, Taiwan. pp 4-13.
- Boag, D. A. 1979. On the cycle of Lymnaea stagnalis (Pulmnata: Gastropoda) in Southwestern Alberta. *Can. J. Zool.* 57 (2): 353-362.
- Bouiw-Bousson, D.; D. Rondelaud, and D. Barthe. 1984. Experimental infection of Lymnaea glabra and L. truncatula by Fasciola hepatica. *J. Parasitol.* 70 (5): 847-848.
- Brenes, R. R. y J.B. Soto. 1968. Contribución al estudio de la clase Trematoda con especial referencia a Fasciola hepatica. Tesis de Grado. Universidad de Costa Rica. 95 p.

- Brown, D. S. 1978. Pulmonate mollusc as intermediate host for digenetic trematodes. In: Pulmonate Vol. 2. Fretter, Vera and Peake, J. (eds.). Academic Press, New York. pp 288-328.
- Camacho, H. 1979. Ecología y susceptibilidad de Helisoma trivolvis a la infección con Angiostrongylus costaricensis. Tesis de Grado. Universidad de Costa Rica. 75 p.
- Conejo, Marta E. 1985. Influencia de la edad de Vaginulus plebeius en infección natural con Angiostrongylus costaricensis. Tesis de Grado. Universidad de Costa Rica. 41 p.
- Eckert, J. and G. Lämmler. 1972. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. Z. Parasitenkd. 39 (4): 303-322.
- Knaap, W. P. W. van der; C. P. Tensen, F.G.M. Kroese, and L. H. Boerrigter-Barendsen. 1982. Adaptive defence reactions against bacteria in the pond snail Lymnaea stagnalis. Dev. Comp. Immunol. 6 (4): 775-780.
- Kocan, A. A. 1972. Some common North American aquatic snails as experimental host of Angiostrongylus cantonensis - with special reference to Lymnaea palustris. J. Parasitol. 58 (1): 186-187.

- Kralla, R. A. and W. M. Samuel. 1984. Emergence of larval Protostrongylus bougtoni (Nematoda: Metastrongyloidea) from a snail intermediate host, and subsequent infection in the domestic rabbit (Cryptolagus cuniculus). J. Parasitol. 70 (3): 457-458.
- Loker, E. S. 1979. Effects of Schistosomatium douthitte infection on the growth, survival, and reproduction of Lymnaea catascopiun. J. Invertebr. Pathol. 34 (2): 138-144.
- Malek, E.A. 1962. Laboratory Guide and notes for Medical Malacology. Burgess Publishing Company. U.S.A. 154 p.
- Malek, E. A. and T.C. Cheng. 1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press. New York. 398 p.
- Malek, E. A. 1981. Presence of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971 in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30 (1):81-83.
- Monge, E.; E. Arroyo, and E. Solano. 1978. A new definitive natural host of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971, J. Parasitol. 64 (1): 34.
- Morera, P. 1973. Life history and redescription of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22 (5): 613-621.

Morera, P.; F. Pérez; F. Mora, and L. Castro. 1982. Visceral larva migrans-like syndrome caused by Angiostrongylus costaricensis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31: 67-70.

Morera, P. 1985 a. Angiostrongylosis abdominal: transmisión y observaciones sobre su posible control. In: Control and eradication of infectious diseases. An International Symposium. PAHO Copubl. Ser. # 1. Pan American Health Organization, Washington, D. C. pp 230-235.

Morera, P. 1985 b. Abdominal Angiostrongyliasis: a problem of Public Health. Parasitology Today. 1 (6): 173-175.

Morera, P. y L. R. Ash. 1970. Investigación del huésped intermediario de Angiostrongylus costaricensis (Morera y Céspedes 1971). Boletín Chileno de Parasitología. 25 (3-4): 135.

Morera, P. y R. Céspedes. 1971 a. Angiostrongilosis abdominal. Acta Méd. Cost. 14 (3): 159-173.

Morera, P. and R. Céspedes. 1971 b. Angiostrongylus costaricensis n sp (Nematoda: Metastrongyloidea) a new lungworm occurring in man in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 8 (1-2): 173-185.

- Morera, P.; R. Lazo, J. Urquizo, and M. Llaguno. 1983. First record of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes 1971 in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (6): 1460-1461.
- Ogamba, O. and A. H. Goodman. 1976. Fasciola gigantica Cobbold 1856 in the snail. *J. Parasitol.* 62 (1): 33-38.
- Olsen, O. W. 1973. *Animal Parasitism, Their life cycles and ecology*. 3 a. ed. University Park Press. pp 222-246.
- Pascual, J. E.; R. Planas, and H. Aguiar. 1981. Eosinophilic meningoen- cephalitis in Cuba, caused by Angiostrongylus costaricensis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (5): 960-962.
- Rachford, F. W. 1976 a. Host-parasite relationship of Angiostrongylus cantonensis in Lymnaea palustris. I Intramolluscan larval growth and development. *Exp. Parasitology.* 36 (3): 377-381.
- Rachford, F. W. 1976 b. Host-parasite relationship of Angiostrongylus cantonensis in Lymnaea palustris. II Histopathology. *Exp. Parasitology.* 39: 382-392.
- Richards, Ch. S. and J. W. Merritt. 1967. Studies on Angiostrongylus cantonensis in molluscan intermediate host. *J. Parasitol.* 53 (2): 382-388.

- Ruiz, R. J. and P. Morera. 1983. Spermatic artery obstruction caused by Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes 1971. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (6): 1458-1459.
- Smnina, T. 1979. The internal defense system of invertebrates, J. Zool. 29 (4): 622.
- Stpicanska, R. 1979. Physiological indices of the host, Lymnaea tomentosa (Pfeiffer) 1855, reaction of infection with Fasciola hepatica L. larvae. Part 1. Activity and growth, Pol. Arch. Hydrobiol. 26 (4): 515-528.
- Tesh, R. A.; L. J. Ackerman; W. Dietz; W. and J. A. Williams. 1973. Angiostrongylus costaricensis in Panamá. Prevalence and pathologic findings in wild rodents infected with the parasite. Am. Trop. Med. Hyg. 22: 348-356.
- Tonn, R. J.; G. H. Hunter III; M. Alfaro. A. Zúñiga, and D. L. Redmond. 1964. Seasonal incidence of larval trematodes in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 12: 59-65.
- Ubelaker, J. E. and N. M. Hall. 1979. First report of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes 1971, in the United States. J. Parasitol. 65 (2): 307.

Ubelaker, J. E.; J. Caruso and A. Peña. 1981. Experimental infection of Sigmodon hispidus with third-stage os Angiostrongylus costaricensis. J. Parasitol. 67 (2): 219-221.

Wallace, C. D. and L. Rosen. 1969. Techniques for recovering and identifying larvae of Angiostrongylus cantonensis from molluscs. Malacologia. 7: 427-438.